

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ
(НИИ медицинской генетики)

на правах рукописи



Зарубин Алексей Андреевич

**ЭКСПРЕССИЯ МИКРОРНК И МЕТИЛИРОВАНИЕ
ДНК В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ
СОННЫХ АРТЕРИЙ**

1.5.7 – генетика

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Назаренко Мария Сергеевна

Томск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1 Атеросклероз: определение и факторы риска	12
1.2 Патогенез и патоморфология атеросклеротического поражения артерий	14
1.3 Экспрессия микроРНК при атеросклерозе	18
1.4 Метилирование ДНК при атеросклерозе	23
1.5 Полиморфизм генов микроРНК при атеросклерозе	27
1.6 Заключение	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	32
2.1 Дизайн исследования, объем и структура материала	32
2.2 Клиническая характеристика пациентов.....	33
2.3 Молекулярно-генетические методы	34
2.3.1 Выделение нуклеиновых кислот и оценка их качества	34
2.3.2 Приготовление кДНК-библиотек микроРНК и их секвенирование	37
2.3.3 Бисульфитная конверсия ДНК и оценка уровня метилирования ДНК на микрочипах.....	38
2.3.4 Приготовление экзомных ДНК-библиотек и их секвенирование.....	40
2.3.6 Используемые электронные ресурсы и базы данных.....	43
2.3.7 Биоинформатический и статистический анализ.....	43
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	45
3.1 Анализ экспрессии микроРНК в сонных артериях	45
3.1.1 Оценка профиля экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий	45
3.1.2 Анализ дифференциальной экспрессии микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий.....	48
3.1.3 Характеристика спектра дифференциально-экспрессирующихся микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий.....	50
3.1.4 Деконволюция клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК.....	55
3.1.5 Анализ модулей коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий	57
3.2 Оценка профиля метилирования ДНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий	60
3.3 Оценка экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий	68
3.4 Связь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий	74
3.4.1 микроРНК – регуляторы метилирования ДНК.....	74
3.4.2 Корреляция экспрессии микроРНК с метилированием ДНК.....	76
3.5 Идентификация полиморфизма в структуре зрелой микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом	79
3.5.1 Сопоставление результатов экзомного секвенирования с секвенированием микроРНК.....	79

3.5.2 Связь полиморфизма в области генов микроРНК с их экспрессией в атеросклеротических бляшках сонных артерий.....	84
3.5.3 Анализ ассоциаций полиморфного варианта rs2910164 гена <i>MIR146A</i> с атеросклерозом сонных артерий и патогенетически значимыми признаками заболевания	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	118
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	119
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	122
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Атеросклероз – широко распространенное, социально значимое заболевание, осложнения которого являются ведущей причиной смертности и инвалидизации в мире [1–3]. Клинические проявления заболевания зависят от локализации и степени атеросклеротического поражения артерий. В частности, атеросклероз сонных артерий, который проявляется в виде хронического нарушения мозгового кровообращения, транзиторных ишемических атак головного мозга или ишемического инсульта, занимает второе место по частоте встречаемости и медико-социальной значимости после атеросклероза коронарных артерий [4; 5].

Атерогенез является динамичным и комплексным патологическим процессом, в основе которого лежит большое количество различных причин [6]. Факторы риска атеросклероза и его осложнения имеют существенную генетическую компоненту: их наследуемость варьирует от 20 до 90% [7–9]. Однако анализ ассоциаций однонуклеотидного полиморфизма (SNP) отдельных генов кандидатов и широкогеномные исследования ассоциаций (GWAS) позволяют выявить генетическую компоненту факторов риска атеросклероза, но не проявляет всего спектра молекулярных механизмов патологических изменений, происходящих в стенке артерий, особенно на поздних стадиях при развитии сосудистых осложнений, объясняя не более 25% совокупного риска сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклерозом [10–14].

Поскольку далеко не все случаи развития атеросклероза удается объяснить известными на настоящий момент генетическими факторами, последнее время большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в различных клетках, в том числе и в органах-мишенях при патологии [15]. К таким механизмам, регулирующим экспрессию генов и фенотип клеток без изменений в нуклеотидной последовательности ДНК, относят метилирование ДНК и РНК-интерференцию. Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов через модификацию остатков цитозина в CpG-сайтах генома, а микроРНК являются молекулами, которые контролируют экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне через взаимодействие с мРНК генов-мишеней.

В настоящее время накапливаются данные кандидатных и крупномасштабных эпигеномных исследований ассоциации (EWAS), а также секвенирования микроРНК (miRNA-seq), в которых показана тесная связь метилирования ДНК лейкоцитов и уровня микроРНК сыворотки крови с факторами риска и осложнениями атеросклероза, что предоставляет возможность идентификации индивидов из группы высокого риска развития острых сосудистых событий [16–22].

С другой стороны, эпигенетические модификации потенциально обратимы, что позволяет разрабатывать новые профилактические и терапевтические подходы для воздействия на атеросклеротически пораженные артерии [23–27]. Однако работ, связанных с изучением эпигенетических механизмов регуляции активности генов, в клетках патоморфологического субстрата заболевания – атеросклеротических бляшек, относительно немного и их результаты противоречивы [21; 28; 29].

Атеросклеротические бляшки артерий на поздней стадии патологического процесса достаточно хорошо охарактеризованы с помощью гистологического исследования [30]. Однако существуют сложности использования существующей гистологической классификации в отношении атеросклеротических бляшек, которые имеют высокий риск нестабильности и развития острых сосудистых событий. Кроме того, атеросклеротические бляшки сонных артерий, полученные при оперативном вмешательстве – каротидной эндартерэктомии, часто имеют измененную морфологию. Можно предположить, что профили метилирования ДНК и экспрессии микроРНК будут информативны для молекулярной классификации образцов атеросклеротических бляшек.

Эпигеном тесно связан с геномом, поскольку генетические варианты в области CpG-сайтов изменяют профиль метилирования ДНК и связывание транскрипционных факторов, а в области генов микроРНК – их структуру или экспрессию [31–34]. МикроРНК сами могут быть мишенями для эпигенетических модификаций, в том случае, когда в области промоторов генов микроРНК изменяется уровень метилирования ДНК, что приводит к изменению их экспрессии [34]. В свою очередь микроРНК способны изменять уровень метилирования ДНК, регулируя ДНК-метилтрансферазу или метил-ДНК связывающие белки [35]. Показано, что метилирование ДНК в области генов микроРНК выше по сравнению с белок-кодирующими генами [36]. Более того, в некоторых регионах хромосом, обогащенных CpG-сайтами, а также в CpG-«островках» содержится большое число микроРНК [37].

Однако работы, в которых проводится интеграция разных молекулярных данных (генетического полиморфизма, эпигенетических факторов, экспрессии генов) и оценивается их связь с патогенетически значимыми признаками атеросклероза, как многофакторного заболевания, единичны [21; 38–42]. Такой интегративный подход может дополнить существующие представления о патогенезе, а также генерировать новые знания, в том числе определить ключевые терапевтические молекулярные мишени, обеспечивая основу для прецизионной медицины.

Степень научной разработанности темы исследования

В целом, работ, связанных с изучением эпигенетических механизмов регуляции активности генов, метилирования ДНК и экспрессии микроРНК, в различных клетках и тканях человека, особенно в патоморфологическом субстрате заболевания – атеросклеротических бляшках, относительно немного.

Большинство работ сфокусировано на поиске биомаркеров острых сосудистых событий через определение экспрессии микроРНК в плазме/сыворотке у пациентов с атеросклерозом [21; 29; 43]. В исследованиях, посвящённых изучению экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий, чаще всего используется кандидатный подход [28] или микрочиповые технологии [44–46].

Данные методические подходы сопряжены с определёнными недостатками, так как исследователи имеют возможность изучать только уже известные микроРНК, остальные же микроРНК игнорируются. Кроме того, существует значительная проблема привлечения и сравнения собственных результатов с теми, которые были получены в других научных коллективах по причине несопоставимости данных разных платформ. Массовое параллельное секвенирование микроРНК (miRNA-seq) свободно от таких недостатков, но на данный момент этот подход не применялся для исследования ткани самой атеросклеротической бляшки, а только в плазме или в цельной крови у пациентов [47].

Уровень и рисунок метилирования ДНК изменяется в клетках поражённых атеросклерозом артерий, он зависит от исследуемого сосудистого русла, а также стадии патологического процесса [48–59]. Внимание исследователей при обследовании пациентов с атеросклеротическим поражением артерий различной локализации, главным образом, уделяется анализу метилирования ДНК в области промоторов белок-кодирующих генов. Лишь в нескольких работах отмечается изменение уровня метилирования ДНК в области генов микроРНК [31; 49–51; 53; 54; 60].

Однако результаты исследований, связанных с изучением метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек, плохо согласуются друг с другом. В частности, спектр дифференциально метилированных CpG-сайтов и микроРНК различается между исследованиями. Среди основных причин могут быть разные методы, исследование артерий разной локализации и с разной стадией патологического процесса, этнические особенности индивидов и влияние факторов среды. Важной причиной низкой сходимости результатов разных исследований может являться различие в клеточном составе изучаемых образцов, поскольку все вышеуказанные работы проведены с использованием цельных образцов артерий. В связи с этим, актуальным является анализ профилей метилирования ДНК и

экспрессии микроРНК в определенных артериях, а также оценка их связи с клеточным составом и клиническими признаками атеросклероза.

Работы, использующие интегративный подход для изучения связи экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и генетического полиморфизма в области генов микроРНК одновременно в одной и той же атеросклеротической бляшке у человека *in vivo*, ранее не проводились. Поскольку эти механизмы могут взаимно дополнять друг друга, обеспечивая функционирование обратной связи, это представляется актуальным и может позволить обнаружить новые патогенетически значимые механизмы развития атеросклероза.

Метилирование ДНК и экспрессия микроРНК – это тканеспецифичные эпигенетические явления, которые контролируют процесс развития клеток, поэтому можно предположить, что анализ данных эпигенетических маркёров позволит выявить источник их происхождения, в том числе сосудистый бассейн. В связи с этим, эпигенетические модификации могут являться потенциальными биомаркерами для прогноза и диагностики осложненного течения атеросклеротического поражения артерий.

Цель исследования

Выявление особенностей эпигенетических модификаций в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом на основе интегративного анализа экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и генетического полиморфизма.

Задачи исследования

1. Оценить профиль экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек и интактных частях сонных артерий, полученных от одних и тех же пациентов, с помощью секвенирования микроРНК.
2. Выявить и охарактеризовать спектр дифференциально-экспрессирующихся микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и интактных частей сонных артерий.
3. Оценить профиль метилирования ДНК и его связь с экспрессией микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий.
4. Провести деконволюцию клеточного состава сонных артерий, пораженных атеросклерозом, на основании профилей экспрессии микроРНК и метилирования ДНК.
5. Идентифицировать генетический полиморфизм в структуре зрелой микроРНК и оценить его связь с экспрессией микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и патогенетически значимыми признаками заболевания.

Научная новизна

В результате диссертационной работы впервые был охарактеризован уровень экспрессии и спектр микроРНК в атеросклеротически поражённых и интактных сонных артериях у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом с помощью микроРНК секвенирования. Разработан оригинальный подход для деконволюции клеточного состава артериальной стенки с использованием данных об уровне метилирования ДНК и экспрессии микроРНК, на основании которых удалось выделить субфенотипы атеросклеротических бляшек в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации. Между данными субфенотипами атеросклеротических бляшек сонных артерий обнаружены существенные различия по спектру как метилированных CpG-сайтов, так и экспрессированных микроРНК. Анализ коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий выявляет тесную связь микроРНК друг с другом и зависит от прогнозируемой доли клеточных компонент и степени поражения артерий атеросклерозом. Впервые в настоящем исследовании проведен интегративный анализ профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и экзомного секвенирования лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Выявлены кандидатные CpG-сайты и микроРНК, которые обеспечивают взаимосвязь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Впервые охарактеризован спектр функционально значимых полиморфных вариантов в структуре зрелых микроРНК у пациентов с выраженным атеросклерозом сонных артерий. Впервые установлена ассоциация аллеля C и генотипов CC+CG rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития атеросклероза сонных артерий у жителей западной Сибири славянских национальностей.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные в ходе выполнения настоящего диссертационного исследования новые знания расширяют представление о спектре экспрессируемых в атеросклеротических бляшках микроРНК, полиморфных вариантах в их структуре, а также их связи с метилированием ДНК и клеточным составом. Сформированные в результате исследования списки дифференциально-экспрессированных микроРНК и дифференциально-метилированных CpG-сайтов между интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией представляют интерес для дальнейшего изучения на предмет выделения потенциальных биомаркёров и мишеней для лечения атеросклероза сонных артерий. Разработанные подходы для деконволюции клеточного состава артериальной стенки с использованием данных об уровне метилирования ДНК и экспрессии микроРНК могут быть

адаптированы для применения при проведении других исследований, затрагивающих не только атеросклероз, но и другие патологии, особенно в случае высокой клеточной гетерогенности образцов тканей. Созданный алгоритм для обработки данных микроРНК секвенирования с последующим точным извлечением информации о полиморфизмах в их структуре может быть использован для получения нового уровня данных при проведении экспериментов по секвенированию микроРНК.

Методологическая основа диссертационного исследования

В работе использованы современные методы молекулярно-генетического, статистического и биоинформатического анализа, а также методы клинического и параклинического обследования пациентов, гистологического анализа тканей артерий. Молекулярно-генетические методы включали секвенирование микроРНК, гибридизацию на биологических микрочипах, экзомное секвенирование и ПЦР-ПДРФ анализ. В ходе выполнения диссертационной работы использован широкий спектр методов биоинформационного и статистического анализа данных, реализованных в программной статистической среде R/Bioconductor.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом в клетках атеросклеротических бляшек и интактных частях сонных артерий существуют различия в профиле экспрессии широкого спектра микроРНК, которые демонстрируют плеiotропное влияние в отношении регуляции многих генов-мишеней, сигнальных путей и заболеваний.
2. В пораженных атеросклерозом и интактных частях сонных артерий клеточный состав выступает в качестве значимого фактора, связанного с профилем метилирования ДНК, спектром и уровнем экспрессии микроРНК. Специфичность метилирования ДНК и экспрессионные профили микроРНК позволяют выделить субфенотипы атеросклеротических бляшек в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации.
3. При атеросклерозе в клетках сонных артерий наблюдается взаимная регуляция эпигенетических процессов: экспрессия микроРНК зависит от метилирования CpG-сайтов в области промотора их генов, а микроРНК вовлечены в регуляцию экспрессии генов, белковые продукты которых участвуют в контроле метилирования ДНК.
4. Полиморфизм rs2910164 гена *MIR146A* ассоциирован с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий у жителей Западной Сибири славянских национальностей.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных методов (секвенирования микроРНК, метилочипов, экзомного секвенирование), привлечением внешних данных из открытых источников и баз (FANTOM5, miRTarBase, HMDD, gnomAD, GEO) и валидацией результатов с использованием альтернативных методов, а также использованием релевантных методов математической статистики и биоинформатики при соблюдении необходимых требований к условиям их применения.

Личный вклад автора

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, экспериментальная работа, биоинформатическая обработка данных, анализ и статистическая обработка собственных результатов, а также написание диссертации выполнены лично автором. Диссертант участвовал на всех этапах опубликования полученных результатов и их представления на научных конференциях.

Апробация материалов диссертации

Основные результаты работы докладывались на конгрессах Европейского общества атеросклероза (European Atherosclerosis Society Congress, EAS) в 2018-2022гг., международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии», (BGRS/SB) в 2018г. и 2020г., Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» 2018г. и 2021г., Всероссийском конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» в 2018г., 2020г., и 2022г. конференции «Молекулярная диагностика 2018», VII съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященном 100-летию кафедры генетики СПбГУ в 2019 г., конференции «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» в 2019г., одиннадцатой международной школе молодых ученых (Systems Biology and Bioinformatics – SBB-2019), I Международном форуме геномных и биомедицинских технологий «От рождения до активного долголетия» в 2021г. Выступления на конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» в 2018г., 2020г., и 2022г., Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» 2018г., I Международном форуме геномных и биомедицинских технологий «От рождения до активного

долголетия» в 2021г. отмечены победами в конкурсе молодых ученых (за лучший стендовый доклад, а также II, I, II и I место за лучшие устные доклады, соответственно).

Публикации

Основные результаты по теме диссертации изложены в 23 печатных изданиях, 5 из которых изданы в журналах, рекомендованных ВАК, 4 – в периодических научных журналах, индексируемых Web of Science или Scopus, 18 – в тезисах докладов научных конференций. Зарегистрированы 2 программы для ЭВМ.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения и 3 приложений. Полный объем диссертации составляет 124 страниц, включая 27 рисунков и 21 таблицу. Список литературы содержит 219 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Атеросклероз: определение и факторы риска

Атеросклероз – это хроническое воспалительное заболевание, которое характеризуется изменением клеточного состава стенки крупных и средних артерий в ответ на патологические стимулы с формированием атеросклеротических бляшек и является причиной таких клинических осложнений, как ишемическая болезнь сердца (инфаркт миокарда), хроническая ишемия головного мозга (ишемический инсульт), ишемия нижних конечностей (перемежающаяся хромота, гангрена) и т.д. [5]

Атеросклероз представляет собой социально значимое заболевание, которое обуславливает высокую долю смертности или инвалидности в мире, так каждый год от заболеваний, связанных с атеросклерозом, умирают примерно 17,9 миллиона человек. Только за 2019 год в России от болезней системы кровообращения умерло больше 840 тысяч человек, из них диагноз «атеросклероз» установлен у более чем 260 тысяч [1; 2].

Атеросклероз в течение десятилетий протекает бессимптомно и часто поражает несколько сосудистых русел [4]. Клинические проявления зависят от локализации и степени атеросклеротического поражения артерий. Атеросклеротическое поражение коронарных артерий со степенью стеноза просвета артерий более 70%, которое проявляется в виде ишемической болезни сердца (ИБС), острого коронарного синдрома или инфаркта миокарда, находится на первом месте по частоте и медико-социальной значимости.

Экстракраниальные (сонные) артерии поражаются чаще среди других сосудов, обеспечивающих кровоснабжение головного мозга. Основным клиническим проявлением атеросклеротического поражения артерий данной локализации является хроническое нарушение мозгового кровообращения, транзиторные ишемические атаки (ТИА) и ишемический инсульт (ИИ). Третье место по частоте атеросклеротического поражения занимают магистральные артерии нижних конечностей, патологический процесс в которых проявляется клинически перемежающейся хромотой или гангреной [5].

Атеросклероз является многофакторной патологией, для которой описаны более 200 факторов риска [61]. Тем не менее, подавляющее большинство случаев заболевания можно объяснить относительно небольшим числом факторов риска, среди которых - мужской пол, возраст старше 50 лет, гиперлипидемия, артериальная гипертензия, гипергомоцистеинемия, курение, ожирение, сахарный диабет и гиподинамия.

Современные представления о факторах риска, способствующих атеросклерозу, в большинстве своём, были установлены при проведении эпидемиологических исследований и исследований менделевских форм заболеваний, таких как семейная гиперхолестеринемия.

Неслучайно, гиперлипидемия выступает в качестве основного фактора риска атеросклероза, а низкий уровень липидов в крови ассоциирован со сниженным риском заболевания, даже если присутствуют другие факторы риска [62].

Факторы риска атеросклероза и его осложнения имеют существенную генетическую компоненту: их наследуемость варьирует от 20 до 90% [7–9]. Однако полиморфизм, оцененный на уровне однонуклеотидных генетических вариантов (single nucleotide polymorphisms – SNPs), объясняет не более 25% совокупного риска сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ), связанных с атеросклерозом [10–14]. Согласно базе данных GWAS Catalog, содержащей агрегированные данные широкогеномных ассоциативных исследований (Genome-Wide Association Studies – GWAS), 1743 SNPs связаны с риском развития ИБС, а 314 SNPs с риском развития ИИ. Ассоциация с атеросклерозом, включая его различные типы, показана для 261 локусов генома [9; 63; 64].

Патологические фенотипы, связанные с атеросклерозом коронарных и сонных артерий – ИБС и ИИ соответственно, отчасти имеют сходную генетическую структуру предрасположенности [13]. Ассоциации с патологией, установленные в результате GWAS, необходимо подтверждать в различных популяциях из-за существующих особенностей их генетической структуры [65]. Меньшая часть SNPs, ассоциированных с атеросклерозом коронарных и сонных артерий, локализуется в области генов, белковые продукты которых связаны с известными факторами риска ССЗ (уровень липидов в крови, уровень артериального давления и т.д.) [63; 66]. В то же время, функциональная значимость существенной части генетических вариантов остается неизвестной. Предполагается, что в этом случае патогенетические механизмы атеросклероза реализуются в клетках артерий.

Следует отметить, что большая доля генетического риска развития атеросклеротического поражения коронарных артерий обусловлена SNPs, расположенными в клеточно-специфичных регуляторных регионах генома – промоторах и энхансерах [67]. Причем 21 генетический вариант, ассоциированный с ИБС и ИИ по данным GWAS, связан с морфологическими характеристиками атеросклеротических бляшек (содержанием липидов, кальцификацией, геморрагиями, количеством гладкомышечных клеток) [64].

Поскольку далеко не все случаи развития атеросклероза удается объяснить генетическими факторами, последнее время достаточно большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в различных клетках, в том числе и в органах-мишенях при патологии [15; 23; 68–71].

Под «эпигенетикой» понимают совокупность механизмов, посредством которых происходит поддержание определенного фенотипа клеток и возможна его модификация (через изменение экспрессии генов) без изменений в последовательности ДНК [72–74]. Известно

несколько механизмов, которые могут регулировать хромосомную организацию и активность генов, но к числу наиболее активно изучаемых относятся метилирование ДНК и некодирующие РНК (например, микроРНК). Метилирование ДНК регулирует экспрессию генов через модификацию остатков цитозина в CpG-сайтах генома, а микроРНК являются молекулами, которые контролируют экспрессию генов на пост-транскрипционном уровне через взаимодействие с мРНК.

В настоящее время накапливаются работы – крупномасштабные эпигеномные исследования ассоциаций (EWAS), в которых оценивается связь эпигенетических маркеров, преимущественно метилирования ДНК, с факторами риска и патологическими фенотипами атеросклероза [16–22]. Показано, что эпигеном представляет собой связующее звено между хранящейся в геноме информацией и влиянием факторов среды при формировании промежуточных и конечных патологических фенотипов сердечно-сосудистой системы, обусловленных атеросклерозом [75; 76].

Эпигеном – динамичен, он меняется с возрастом и в ответ на воздействие факторов внешней среды. С другой стороны, эпигеном тесно связан с геномом, поскольку генетические варианты в области CpG-сайтов изменяют профиль метилирования ДНК, а в области генов микроРНК – их структуру или экспрессию [31–34; 77–81]. Остается неясным, будут ли эпигенетические модификации объяснять «потерянную наследуемость», однако их потенциальная обратимость послужит основой для разработки новых подходов к лечению и профилактике сердечно-сосудистых заболеваний [23].

Таким образом, ни один из факторов риска атеросклероза не может самостоятельно объяснить данное заболевание, но их рассмотрение в совокупности даст основу для реконструкции целостной картины патологического процесса, в том числе происходящего в стенке артерий. В процессе формирования атеросклеротических бляшек, являющихся морфологическим субстратом заболевания, участвуют различные клетки, которые будут рассмотрены в следующем подразделе данной главы.

1.2 Патогенез и патоморфология атеросклеротического поражения артерий

На данный момент времени «реакция на повреждение» является одной из ведущих гипотез атерогенеза. Она была предложена в 1976 г. K. Ross и L. Harker как модификация оригинальной теории Вирхова [82]. В ответ на разнообразные метаболические, механические, химические или инфекционные повреждения возникает нарушение проницаемости эндотелия и локальное воспаление стенки артерии. Такое же воспаление могут инициировать высокие гемодинамические нагрузки, токсины, иммунные комплексы, вирусы [83]. Эти повреждения

инициируют миграцию иммунных клеток в стенку сосуда, накопление липидов, изменение фенотипа и пролиферацию гладкомышечных клеток.

На начальных этапах эти изменения считаются обратимыми и представляют собой липидные пятна или полосы на внутренней стенке артерии. В процессе развития патологического процесса липидные полосы артерий постепенно перерастают в атеромы и бляшки. Острый разрыв или эрозия этих бляшек вызывает местный тромбоз, приводящий к частичной или полной окклюзии пораженной артерии [5].

Развитие атеросклеротической бляшки представляет собой хронический процесс, занимающий несколько десятилетий. Гистологически атеросклеротические бляшки могут содержать различные клетки (иммунные, гладкомышечные и др.) и элементы (липидное ядро, фиброзную покрышку, кальцификаты, тромботические отложения). На основании наличия различных элементов, их размеров и соотношения строится патоморфологическая классификация атеросклероза (Рисунок 1) [30].

Исследования клеточного состава артерий при их поражении атеросклерозом начаты с изучения гистологических срезов с различными неспецифическими окрасками (гематоксилин-эозин, Ван-Гизон и др.). В результате выявлен воспалительный компонент, фиброз, неоваскуляризация и формирование липидно-некротического ядра бляшки, а также сформулирована гипотеза о роли повреждения покрышки в риске развития острых сердечно-сосудистых событий [84].

Однако происходящие количественные и качественные изменения в клеточном составе стенки артерий при атеросклерозе стали ясны лишь с разработкой методов изучения антигенов, маркирующих различные типы клеток (иммуногистохимия, проточная цитофлуориметрия и т. д.), а также технологических подходов, которые позволяют оценить функциональную активность генов, как в целом в ткани артерий, так и на уровне их отдельных клеток (scRNAseq). В результате этих исследований показано, что иммунные, эндотелиальные и гладкомышечные клетки изменяют свой фенотип и свойства, а также взаимодействуют друг с другом при прогрессировании атеросклеротического поражения [85–88].

Изучение эндотелиальных клеток (ЭК) выявило изменение в их функциональном состоянии при инфильтрации липопротеинами (ЛП), так как эндотелий в норме активно, воздействуя аутокринным и паракринным образом, поддерживает сосудистый гомеостаз. Однако изменение фенотипа эндотелиальных клеток в дисфункциональное состояние представляет собой фактор риска для некоторых сосудистых заболеваний, включая атеросклероз.

Номенклатура и гистология	Этапы развития атеросклероза	Механизм роста	Начало	Клиническая картина
Тип I - начальное повреждение Рассеянные пенистые клетки	<pre>graph TD; I((I)) --> II((II)); II --> III((III)); III --> IV((IV)); IV --> V((V)); V --> VI((VI)); VI --> V</pre>	Накопление липидов	Первые 10 лет	Без клинических проявлений
Тип II - липидные полосы Отложения пенистых клеток и нагруженных липидами гладкомышечных клеток			С 30 лет	
Тип III - промежуточный, преатерома Клетки, нагруженные липидами, рассеянные внеклеточные липидные вкрапления и нарушения целостности интимы				
Тип IV - атерома Крупные экстраклеточные. включения, сливающиеся в большое липидное ядро		Пролифе- рация ГМК и синтез коллагена	С 40 лет	С/без клинических проявлений
Тип V - фиброатерома Липидное ядро и толстые слои фиброзной соединительной ткани				
Тип VI - сложное поражение Трещины, гематомы и внутренние тромбы		Тромбоз и/или гематома		

Рисунок 1 – Гистологическая классификация атеросклеротических бляшек [30].

В то же время, в некоторых областях сосудистого русла эндотелий предрасположен к патологическому провоспалительному фенотипу, что связано с наличием механочувствительности у этих клеток. Ламинарный поток крови является фактором устойчивости к атеросклерозу и тромбозу, в то время как его нарушение (например, в точках ветвления сосудов), способствует усугублению провоспалительного фенотипа и повышенной

проницаемости эндотелиального слоя для ЛП [89]. Несмотря на изначальное присутствие в стенке артерии клеток с дисфункциональным фенотипом, при атерогенезе существенная часть эндотелиальных клеток меняет свой фенотип на провоспалительный.

Накопление иммунных клеток является ключевым фактором для формирования хронического очага воспаления артерий. В атеросклеротической бляшке присутствуют клетки иммунной системы (макрофаги, Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки и др.) [90]. Однако каждая из субпопуляций клеток иммунной системы играет свою роль в атерогенезе. В стенке артерии субэндотелиальное связывание липопротеинов плазмы привлекает происходящие из моноцитов макрофаги и Т-хелперы 1 типа (Th1) с образованием атеросклеротических бляшек. Воспаление инициируется врожденными иммунными реакциями на модифицированные липопротеины и поддерживается клетками Th1, которые реагируют на аутоантигены [91].

С прогрессией атеросклеротического поражения артерий количество и роль макрофагов возрастает за счет снижения количества Т-лимфоцитов, пополнения пула макрофагов не только из моноцитов, но и из стромальных клеток, в частности гладкомышечных, в результате дедифференцировки [92] и формирования пролиферирующей популяции моноцитов в стенке артерии [93]. Соответственно, среди макрофагов имеется фенотипическая гетерогенность, и это может иметь значение при прогрессии атеросклероза.

Третьим (после эндотелиальных и иммунных клеток) важным участником атерогенеза являются гладкомышечные клетки (ГМК). Они представляют собой основной тип клеток в меди, осуществляют регуляцию давления в сосудах, а также продуцируют и поддерживают межклеточный матрикс. При накоплении ЛП и инициации воспаления, ГМК мигрируют в интиму, принимая активное участие в формировании покрышки бляшки. Они меняют свой фенотип с сократительного (нормального) на синтетический, продуцируя коллаген, а также активно пролиферируют [94]. Впоследствии ГМК приобретают макрофаго-подобный фенотип, экспрессируя макрофагальные маркеры (CD68), что имеет негативное значение в прогрессии бляшки, так как после поглощения ЛП, ГМК превращаются в пенистые клетки и гибнут вследствие некроза [95].

Кроме того, модифицированные липопротеины индуцируют в эндотелиальных и гладкомышечных клетках экспрессию молекул адгезии (VCAM1 и ICAM1), хемоаттрактантов (например, MCP1) и факторов роста (например, M-CSF и GM-CSF), которые взаимодействуют с рецепторами на моноцитах и стимулируют их рекрутирование, миграцию и дифференцировку в макрофаги и дендритные клетки [96; 97].

Таким образом, атерогенез представляет собой комплексный процесс, включающий в себя различные изменения на уровне отдельных клеток и молекул. Не вызывает сомнения, что данные изменения сопряжены с регуляцией функциональной активности многих генов в клетках, что

осуществляется с помощью эпигенетических механизмов, в том числе РНК-интерференции через молекулы некодирующих РНК.

1.3 Экспрессия микроРНК при атеросклерозе

МикроРНК – регуляторные, эволюционно консервативные, некодирующие одноцепочечные РНК длиной от 16 до 27 нуклеотидов. МикроРНК способны регулировать экспрессию генов через деградацию мРНК или репрессию трансляции мРНК-мишеней в цитоплазме клеток [98]. Отдельные микроРНК могут активировать транскрипцию генов, действуя как триггеры энхансеров [99]. В тканях человека обнаружено более 2500 микроРНК, которые согласно биоинформатическим предсказаниям, могут регулировать экспрессию более чем 60% всех белок-кодирующих генов [100; 101].

МикроРНК играют ключевую роль в контроле основных биологических процессов в клетках, включая развитие, дифференцировку, рост и метаболизм. Атерогенез является комплексным патологическим процессом и на каждом из его этапов от ранней дисфункции эндотелия до эрозии и разрыва нестабильной атеросклеротической бляшки участвуют различные микроРНК, причём одни и те же микроРНК могут оказывать разнонаправленное влияние (атерогенное или атеропротективное) в зависимости от стадии патологического процесса [43; 99; 102–107].

Используя информацию о публикациях из баз данных HMDD [108], miRNet [109], miRwayDB [110], нами была создана реферируемая база данных, содержащая информацию о 85 публикациях, в которых оценивалась экспрессия более 170 микроРНК в атеросклеротических бляшках, крови, сыворотке у пациентов с атеросклерозом [111]. Данная база содержит информацию о направлении изменения уровня экспрессии микроРНК и уровне статистической значимости этого изменения. В результате выявлено, что уровень экспрессии 173 микроРНК анализировался в более чем одном исследовании, из них для 91 (53%) микроРНК показано согласованное изменение экспрессии в разных исследованиях.

Наиболее часто в данных работах анализировалась экспрессия miR-126 (27 работ). Для данной микроРНК получено 95 оценок уровня экспрессии, это связано с тем, что в некоторых исследованиях проводилось несколько измерений. Статистически значимые результаты выявлены для 48 измерений, из них понижение уровня экспрессии miR-126 было определено в 30 (63%) случаях, а повышение – в 18. Причинами обнаруженных противоречий в уровне экспрессии данной микроРНК являются различие в биоматериале и используемых методах. Например, уровень экспрессии miR-126 снижается в эндотелиальных клетках при воздействии различными провоспалительными молекулами (IL-3, bFGF, TNF-α, ox-LDL) и статинами, но повышается при создании напряжения сдвига [111].

У человека для анализа экспрессии микроРНК доступны плазма или сыворотка крови, а также образцы сонных артерий, полученных в результате каротидной эндартерэктомии [29]. Большинство работ сфокусировано на поиске биомаркеров острых сосудистых событий через определение экспрессии микроРНК в плазме/сыворотке у пациентов [21; 29; 43].

В систематическом обзоре Sharma A.R. et al. (2020) выявлено, что 155 микроРНК, определяемых в сыворотке/плазме крови индивидов, ассоциированы с ИБС, острым коронарным синдромом, инфарктом миокарда, ишемическим и геморрагическим инсультами [21]. Из них 33 микроРНК обнаружены в более чем одном исследовании. С острым коронарным синдромом связаны miR-122, -140-3p, -720, -2861, -3149, -21, -941, -499 и -210, а с ишемическим инсультом miR-223. Общими для патологических фенотипов коронарного и каротидного атеросклероза были 18 микроРНК.

В атеросклеротических бляшках сонных артерий экспрессия микроРНК изучалась с использованием различных методов и групп сравнения (Таблица 1). В целом, таких работ немного. В пионерском исследовании Raitoharju E. et al., 2011 с использованием микрочипов выявлено 58 дифференциально экспрессированных микроРНК между атеросклеротическими бляшками различной локализации и интактными внутренними грудными артериями [44]. Причем для пяти микроРНК (miR-21, -34a, -146a, -146b-5p и -210) подтверждено увеличение экспрессии в атеросклеротических бляшках в большей по объему выборке тканей артерий с помощью ПЦР в режиме реального времени. Экспрессия 187 мРНК генов-мишеней для данных микроРНК была снижена в атеросклеротических бляшках. Белковые продукты данных генов участвуют в передаче сигнала, регуляции транскрипции и транспорте везикул.

Сравнение экспрессии микроРНК между атеросклеротическими бляшками сонных артерий и интактными внутренними грудными артериями проводилось с использованием микрочипов в двух других работах [45; 46]. Остальные исследования анализировали экспрессию отдельных кандидатных микроРНК в тканях артерий с помощью ПЦР в режиме реального времени [112–117]. Связь экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках с факторами риска атеросклероза (артериальной гипертензией и сахарным диабетом) показана для miR-145 и семейства let-7 [115; 117].

Таблица 1 – Экспрессия микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий человека

Исследование	Технология	Размер выборки	Результат
Raitoharju E. et al., 2011 [43]	Human miRNA Microarray Version 3 (Agilent)/ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=4), интактные внутренние грудные артерии (n=6)/50 образцов артерий	Всего 58 дифференциально экспрессированных микроРНК/Увеличение экспрессии miR-21, -34a, -146a, -146b-5p и -210 в атеросклеротических бляшках
Bidzhekov K. et al., 2012 [45]	Ambion mirVana miRNA Bioarray/ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=5), интактные внутренние грудные артерии (n=3)/10 образцов атеросклеротических бляшек	Всего 255 микроРНК, из них 23 дифференциально экспрессированных/увеличение экспрессии miR-30e-5p, -26b, и -125a, но уменьшение экспрессии miR-520b, и -105 в атеросклеротических бляшках
Cipollone F. et al., 2011 [112]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=53)	Увеличение экспрессии miR-100, -127, -133a, -133b, и -145, в симптоматических атеросклеротических бляшках
Lovren F. et al., 2012 [113]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=5), интактная часть (n=5), парные образцы	Уменьшение экспрессии miR-145 в атеросклеротических бляшках
Nazari-Jahantigh M. et al., 2012 [114]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=4), интактная часть (n=4), парные образцы	Увеличение экспрессии miR-155 и miR-147b в атеросклеротических бляшках
Santovito D. et al., 2013 [115]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=22)	Увеличение экспрессии miR-145 в атеросклеротических бляшках пациентов с артериальной гипертензией
Cao J. et al., 2015 [116]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=10), интактные внутренние грудные (n=10)	Увеличение экспрессии miR-146a и miR-21 в атеросклеротических бляшках
Markus B. et al., 2016 [46]	Human miFinder (SABiosciences)/ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=6), интактные внутренние грудные артерии (n=3)/ Атеросклеротические бляшки (n=24), интактные внутренние грудные артерии (n=15)	Уменьшение экспрессии miR-1, miR-29b и let-7f, но увеличение экспрессии miR-19b, -21, -22 и -143 в атеросклеротических бляшках
Brennan et al., 2017 [117]	ПЦР в режиме реального времени	Атеросклеротические бляшки (n=4)	Уменьшение экспрессии let-7b и let-7d в симптоматических атеросклеротических бляшках, а также у пациентов с сахарным диабетом

В Таблице 2 представлен список 36 микроРНК, для которых проводилась оценка их уровня экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Существенно больший процент микроРНК (69%) характеризовался увеличением уровня экспрессии в атеросклеротических бляшках (например, miR-21, -143, -146a). Лишь пять микроРНК (let-7f, miR-1, -29b, -105 и -520b) отличались снижением уровня экспрессии в атеросклеротических бляшках. Противоречивые результаты получены в отношении экспрессии miR-145 и -10b.

Таблица 2 – Спектр и экспрессия микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий человека

микроРНК	Количество измерений экспрессии микроРНК			Сумма
	Увеличение	Снижение	Нет различий	
miR-100	1 [117]	0	1 [43]	2
miR-133a	1 [117]	0	1 [43]	2
miR-133b	1 [117]	0	1 [43]	2
miR-145	1 [117]	1 [113]	1 [43]	3
miR-1	0	2 [46]	1 [43]	3
miR-9	0	0	2 [46]	2
miR-19b	1 [46]	0	2 [43; 46]	3
miR-21	4 [43; 46; 116]	0	1 [46]	5
miR-22	1 [46]	0	2 [43; 46]	3
miR-29b	0	2 [46]	1 [43]	3
miR-92a	0	0	3 [43; 46]	3
miR-99a	0	0	3 [43; 46]	3
miR-143	2 [45; 46]	0	2 [43; 46]	4
miR-223	0	0	3 [43; 46]	3
let-7f	0	2 [46]	1 [43]	3
miR-146a	2 [43; 116]	0	1 [43]	3
miR-146b-5p	1 [43]	0	1 [43]	2
miR-210	2 [43]	0	1 [116]	3
miR-34a	2 [43]	0	1 [116]	3
miR-520b	0	2 [45]	0	2
miR-105	0	2 [45]	0	2
miR-10b	1 [45]	1 [43]	0	2
miR-218	1 [45]	0	1 [43]	2

Продолжение Таблицы.2

микроРНК	Увеличение	Снижение	Нет различий	Сумма
miR-186	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-489	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-147	2 [45; 114]	0	0	2
miR-422a	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-15b	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-185	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-181a	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-98	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-152	1 [45]	0	1 [43]	2
miR-30e-5p	2 [45]	0	0	2
miR-26b	2 [45]	0	1 [43]	3
miR-125a	2 [45]	0	0	2
miR-155	2 [114]	0	1 [43]	3

Следует отметить, что некоторые микроРНК (miR-145, miR-122, miR-146a) уже сейчас считаются перспективными биомаркерами или потенциальными мишенями для терапии ССЗ [104; 118]. Однако из-за того, что атеросклеротические бляшки артерий имеют высокую клеточную гетерогенность, многие аспекты взаимосвязей данных молекул между собой и регуляции мРНК их генов-мишеней остаются малоизученными.

Методические подходы анализа экспрессии микроРНК с помощью микрочипов и ПЦР в режиме реального времени сопряжены с определёнными недостатками, так как исследователи изучают только уже известные микроРНК. Кроме того, существуют сложности для сравнения результатов, полученных в разных работах, по причине несопоставимости разных платформ микрочипов. Массовое параллельное секвенирование микроРНК (miRNA-seq) свободно от таких недостатков, но на данный момент этот подход не применялся для исследования ткани самой атеросклеротической бляшки, а только для анализа экспрессии микроРНК в плазме или в цельной крови у пациентов [47].

Несмотря на то, что сами микроРНК участвуют в эпигенетической регуляции функциональной активности генов, данные регуляторные молекулы также могут быть мишенями для эпигенетических модификаций, в том случае, когда в области промоторов генов микроРНК изменяется уровень метилирования ДНК, что приводит к изменению их экспрессии. Показано, что метилирование генов микроРНК выше по сравнению с белок-кодирующими генами [36]. Более того, в определенных регионах хромосом, обогащенных CpG-сайтами, а также в CpG-«островках» содержится высокий процент микроРНК [37].

1.4 Метилирование ДНК при атеросклерозе

Метилирование ДНК регулирует экспрессию множества генов на транскрипционном уровне за счёт присоединения метильных групп к цитозину (СрG-сайтов). Ферменты DNMT3a и DNMT3b осуществляют метилирование ДНК *de novo*, а DNMT1 отвечает за поддержание метилирования ДНК во время митоза в соматических клетках [119].

Деметилирование цитозина осуществляется двумя путями: активно (с помощью ферментов) и пассивно (при репликации ДНК в условиях отсутствия активности DNMT1). Активное деметилирование происходит путем окисления (с помощью ферментов ТЕТ) и дезаминированием (посредством действия AID/APOBEC), с последующим исправлением окисленных или дезаминированных нуклеотидов при участии TDG. Часто СрG-богатые области находятся около промоторов генов или в других регуляторных элементах генома [120].

Метилом, в отличие от генома, претерпевает динамические изменения на протяжении всей жизни индивида. Около 70% промоторов генов содержат СрG-«островки» (регионы с 55% СрG-сайтов минимальной протяженностью 0,5 кб), которые обычно, неметилированы, а их гиперметилирование связано с репрессией функциональной активности генов. Уровень метилирования ДНК в СрG-«берегах» больше коррелирует с экспрессией генов, чем в СрG-«островках» [121]. Метилирование ДНК вне СрG-«островков» и «берегов» также может быть ассоциировано с экспрессией генов. Изменение уровня метилирования СрG-сайтов, локализованных в области гена, модулирует активность транскрипции, сплайсинга, регулирует процессинг коротких и длинных некодирующих РНК, тем самым приводя к изменению экспрессии генов [122].

Связь метилирования ДНК в области гена и его экспрессии не является монотонной. Низкий уровень метилирования ДНК в области генов может быть связан как с наиболее низкой, так и с самой высокой их экспрессией, а высокий уровень метилирования – с промежуточным уровнем экспрессии генов [123]. Гиперметилирование ДНК в межгенных и повторяющихся последовательностях генома поддерживает его стабильность.

Исследования метилирования ДНК при атеросклерозе, проведенные на модельных животных, показали, что нарушения в метилировании ДНК клеток предшествуют морфологическим изменениям в стенке артерии при формировании и прогрессии атеросклеротической бляшки [124]. До недавнего времени исследования отдельных клеток, выделенных из стенки артерии человека, были затруднены по техническим причинам, поэтому изучали цельные ткани кровеносных сосудов и атеросклеротических бляшек с помощью кандидатного подхода.

В частности, данный подход был использован для изучения статуса метилирования генов 15-липоксигеназы (*ALOX15*), рецептора эстрогена (*ESR1* и *ESR2*), транспортера 3 монокарбоксилата (*MCT3*) и ингибитора 2 метаболического пути тканевого фактора (*TFPI2*) [125–129]. Однако кандидатный подход к изучению изменений метилирования ДНК при атеросклерозе не позволяет установить закономерности, характеризующие атеросклероз как многофакторный и комплексный процесс. Для одновременной детекции изменения статуса метилирования ДНК в большом количестве регионов генома/генах применяется широкогеномный подход.

В данных работах при обследовании индивидов показано, что уровень и рисунок метилирования ДНК изменяется в поражённых атеросклерозом сосудах [48–59]. Исследования различаются между собой в отношении изучаемых клинических форм патологии, регионов сосудистого русла, стадий патологического процесса, критериев формирования выборок и их популяционных особенностей, а также используемых методических подходов анализа уровня метилирования ДНК и алгоритмов биоинформационной обработки данных. Однако значительное количество экспериментов, связанных с определением уровня метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках, были проведены с использованием микрочипов, произведённых компанией Illumina, которые обладают обратной совместимостью, что позволяет использовать данные, находящиеся в открытых источниках, для сравнительного анализа.

Внимание исследователей при обследовании пациентов с атеросклеротическим поражением артерий различной локализации, главным образом, уделяется анализу метилирования ДНК в области промоторов белок-кодирующих генов. Лишь в нескольких работах выявлено изменение уровня метилирования ДНК в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках (Таблица 3) [50; 51; 53; 54; 58; 60].

Согласно результатам исследований с использованием микрочипов Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina), было установлено и верифицировано снижение уровня метилирования CpG-островок в регионе, кодирующем miR-10b (ген *MIR10B*), в атеросклеротических бляшках правых коронарных и сонных артерий по сравнению с интактными сосудами пациентов [50; 54; 60].

Таблица 3 – Метилирование ДНК в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках артерий человека

Исследование	Технология	Размер выборки	Результат
Nazarenko et al., 2015 [54]	Микрочип Infinium Human Methylation27 BeadChip (Illumina), пиросеквенирование	Атеросклеротические бляшки коронарных артерий (n=6), внутренние грудные артерии (n=6)	Гипометилирование в области гена <i>MIR10B</i> в атеросклеротических бляшках
Wang et al., 2014 [58]	Микрочип GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina), miRCURY LNA Array (Exiqon) и 22K human genome array chip (CapitalBio Corp)	Атеросклеротические бляшки коронарных артерий (n=35), их интактные регионы (n=35)	Дифференциальное метилирование в области гена <i>miR-519d</i>
Aavik et al. 2015 [53]	MeDIP-seq, Illumina HiSeq 2000 (Illumina)	Атеросклеротические бляшки бедренных артерий (n=22), интактные внутренние грудные артерии (n=9)	Более 140 областей генов микроРНК гипометилированы в области атеросклеротических бляшек. Существенное гипометилирование в локусе 14q32 (кластер генов микроРНК)
Zaina et al. 2014 [51]	Микрочип Illumina HumanMethylation450 BeadChip	Атеросклеротические бляшки аорты (n=15) и сонных артерий (n=19), непораженные ткани аорты (n=15)	Дифференциальное метилирование в области гена <i>MIR23B</i>

Китайские исследователи оценивали уровень метилирования ДНК, экспрессию мРНК и микроРНК в пултированных *post mortem* образцах левых передних нисходящих коронарных артерий из области выраженных атеросклеротических бляшек и интактных регионов, используя микрочип GoldenGate Methylation Cancer Panel I (Illumina), miRCURY LNA Array (Exiqon) и 22K human genome array chip (CapitalBio Corp). Выборку больных и контроля формировали разные индивиды, однако данные группы были сопоставимы по полу и возрасту. Авторы выявили не только гены, клеточные процессы и сигнальные пути, участие которых в атеросклерозе рассматривалось ранее, но и некоторые новые гены, сигнальные пути и микроРНК (*miR-519d*) [58].

Коллектив исследователей из Мексики и Испании сравнили уровень метилирования отдельных CpG-сайтов в клетках атеросклеротических бляшек аорты и сонных артерий с непораженными тканями аорты с использованием микрочипа Illumina HumanMethylation450 BeadChip. Причем образцы аорты были взяты у одних и тех же индивидов *post mortem*, а сонные

артерии получены в результате каротидной эндартерэктомии и представляли собой стабильные бляшки III-VI морфогистологических типов. Выборки включали мужчин и женщин, возраст больных варьировал от 36 до 88 лет. Среди дифференциально метилированных генов между бляшками и непораженной частью аорты был выявлен ген *MIR23B*. Изменение уровня метилирования ДНК и его экспрессии подтверждено с помощью альтернативных методов [51].

Финские исследователи с помощью технологии полногеномного бисульфитного секвенирования оценили уровень и рисунок метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках бедренных артерий и интактных образцах внутренних грудных артерий, а также сопоставили их с данными экспрессионных микрочипов. Образцы тканей собраны при проведении операций у разных индивидов. Выборки для исследования не отличались по полу, возрасту и факторам риска ССЗ. Важным результатом работы стало выявление дифференциального метилирования в области генов микроРНК. Более 140 областей генов микроРНК гипометилированы в области атеросклеротических бляшек, включая микроРНК, ранее уже связанные с атеросклерозом (miR-10b, -27b и -758). Существенное гипометилирование выявлено в локусе 14q32, где содержится крупный кластер генов микроРНК. Увеличение экспрессии генов данного кластера (miR-127, -136, -410, -431, -432 и -433) показано ранее в атеросклеротических бляшках. Таким образом, это одно из первых исследований, в котором наиболее убедительно установлена связь метилирования ДНК с экспрессией микроРНК [53].

Однако в одной из недавних работ показано, что экспрессия кластера микроРНК, расположенных в локусе 14q32, значительно различается между здоровыми тканями сосудов различной локализации (n=109). Уровень метилирования ДНК трех регионов скоплений CpG-динуклеотидов (дифференциально метилированных регионов — DMR) в данном локусе также сильно варьирует между разными сосудами и ассоциирован с их патологическими изменениями, но он не связан с экспрессией при-микроРНК (pri-miRNA) и зрелых микроРНК [130].

Таким образом, уровень и рисунок метилирования ДНК в клетках сосудов различной локализации вариабелен и динамичен в различных регионах генома, он зависит от исследуемого сосудистого русла, а также стадии патологического процесса. Работы, связанные с анализом изменения уровня метилирования ДНК в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках, немногочисленны и проведены в цельных и разных по своей локализации сосудах. Неясным остается, есть ли специфичность профиля метилирования ДНК, в том числе в области генов микроРНК, в артериях различной локализации, а также его связь с клеточным составом и клиническими признаками атеросклероза.

1.5 Полиморфизм генов микроРНК при атеросклерозе

Принимая во внимание, что генетическая предрасположенность вносит вклад в риск развития атеросклероза и его осложнений, полиморфизм в генах микроРНК (их регуляторных регионах, в при- и пре-микроРНК (pri-, pre-microRNA), в области нуклеотидной последовательности зрелой микроРНК), в генах их биогенеза и генах-мишенях может быть функционально значим для формирования патологии [131]. В зависимости от расположения полиморфного варианта относительно генов микроРНК функциональные последствия будут различаться (Рисунок 2).

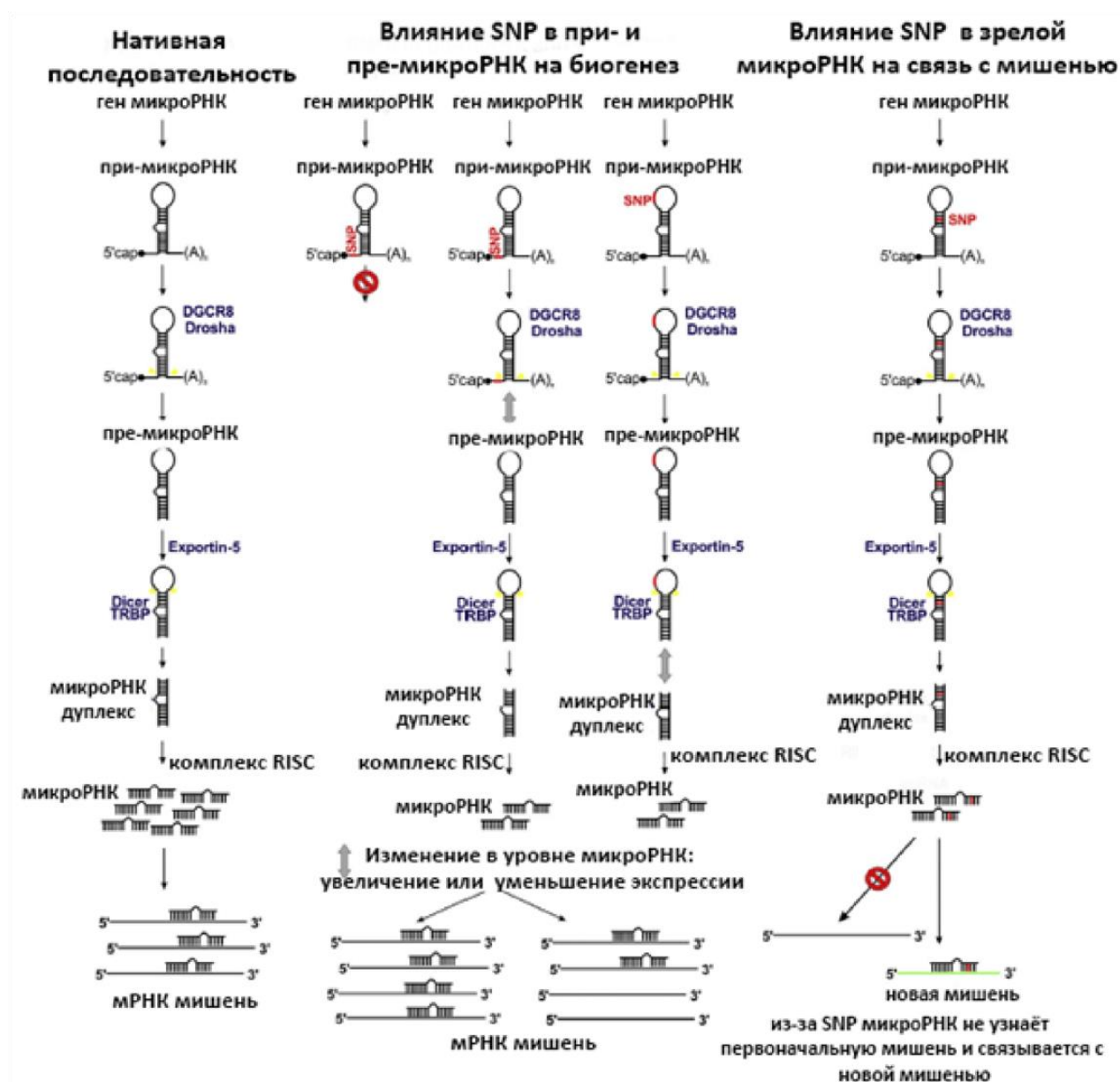


Рисунок 2 – Функциональная значимость одонуклеотидных полиморфных вариантов в области генов микроРНК (адаптировано из статьи Bartoszewski R. и соавт. (2018) [132].

Например, SNPs, находящиеся в регуляторных последовательностях генов микроРНК (промоторы, энхансеры) влияют на скорость транскрипции, что ведёт за собой изменение уровня экспрессии данных молекул. Полиморфизм в при-микроРНК и пре-микроРНК может изменить эффективность созревания микроРНК, нарушая взаимодействие с ферментами биогенеза микроРНК, а также повлиять на количество зрелой микроРНК: снижая или повышая экспрессию. Генетические варианты, которые приходятся на зрелую микроРНК, приводят к нарушению связывания с мРНК-мишенью [132; 133].

Предполагается, что количество полиморфных вариантов в генах микроРНК и особенно в генах их биогенеза меньше, чем для генов-мишеней, поскольку микроРНК консервативны и имеют небольшой размер. В нуклеотидной последовательности 1075 пре-микроРНК выявлено 2257 SNPs, в 207 зрелой микроРНК (регион «сида») – 246 SNPs [134]. В то же время, около 180000 SNPs расположено в области 3'UTR белок-кодирующих генов, то есть теоретически большое количество данных SNPs через мРНК могут быть связаны с микроРНК [135].

К настоящему времени проведены исследования ассоциаций полиморфизма в области генов микроРНК с клиническими осложнениями атеросклероза коронарных и сонных артерий (Таблица 4). Наибольшее количество работ посвящено изучению rs2910164 (*MIR146A*) и rs3746444 (*MIR499A*).

Работы по исследованию ассоциации полиморфного варианта rs2910164:G>C с атеросклерозом коронарных артерий проведены, главным образом, среди представителей населения Китая [146; 148; 149]. Генотип CC и аллель C увеличивали риск ИБС [146; 148]. В работе, где обследовались европейцы, показана связь генотипа CC с риском развития рестеноза коронарных артерий, а не собственно их атеросклеротического поражения [150]. Мета-анализ исследований не показал связи rs2910164:G>C с риском ишемического инсульта в целом [146; 148].

Замена rs2910164:G>C приводит к соответствующей замене нуклеотидов в последовательности пре-микроРНК miR-146a-3p (miR-146a*), при этом затрагивается регион «сида», важный для связывания микроРНК с мРНК-мишенями. В результате нарушается процессинг и конформация вторичной структуры pre-miR-146a и ее стабильность, уменьшается продукция зрелой miR-146a в клеточной линии U2OS [151]. В данной работе показано, что генотип CC и аллель C связаны со снижением экспрессии miR-146a в клетках, что увеличивает содержание мРНК ее мишеней (*IRAK1*, *TRAF6*), внося вклад в формирование провоспалительного профиля и, следовательно, риска заболевания [151]. Однако выявлено, что в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий экспрессия miR-146a была выше по сравнению с интактными тканями [44; 116].

Таблица 4 – Ассоциации полиморфизма в области генов микроРНК с атеросклерозом сонных и коронарных артерий и его осложнениями

SNP	Локализация SNP относительно гена	Аллель/генотип риска	Популяция	Фенотип	PMID
rs2682818	<i>MIR618</i>	TT	Китай	ИИ	2701138 [136]
rs3746444	<i>MIR499A</i>	GG	Китай	ИБС	22159951 [137]
		GG	Китай	ИМ	24850191 [138]
		G/GG+AG	Индия	ИИ	30229913 [139]
		GG+AG	Китай	ИИ	24178064 [140]
rs6505162	<i>MIR423</i>	A/CA	Индия	ИБС	30289085 [141]
rs895819	<i>MIR27A</i>	G	Китай	ИМ	29304813 [142]
rs11614913	<i>MIR196A</i>	T	Мета-анализ	ИИ	26608782 [143]
rs2910164	<i>MIR146A</i>	GG+CG	Мета-анализ	ИБС	25865299 [144]
		C/GC+CC	Китай	ИБС	24447667 [145]
		CC	Мета-анализ	ИБС	26114385 [146]
rs13293512	8 тыс.п.о. от гена <i>MIRLET7A1</i>	TT	Китай	ИИ	27530126 [147]
rs10877887	2 тыс.п.о. от гена <i>MIRLET7I</i>	TT	Китай	ИИ	27530126 [147]

Примечание: ИБС - ишемическая болезнь сердца; ИМ - инфаркт миокарда; ИИ - ишемический инсульт

Для полиморфизма rs3746444:A>G (*MIR499A*) установлены стабильные ассоциации с развитием ИБС, ИМ и ИИ в популяциях Китая и Индии [138–140]. Исследования механизма реализации данной связи показали, что полиморфизм rs3746444 не влияет на транскрипцию *MIR499* и на уровень pre-miR-499, но при этом аллель G снижал уровень экспрессии зрелой miR-

499-5p в культуре кардиомиоцитов (H9c2), не влияя на уровень экспрессии pre-miR-499-5p, гена *MIR499A* [152].

Таким образом, большинство исследований ассоциаций полиморфных вариантов в генах микроРНК с атеросклерозом проведены в популяциях Азии. В связи с этим, является актуальным анализ ассоциаций полиморфизма генов микроРНК с атеросклерозом и его осложнениями в европейских популяциях. Изучение генетического полиморфизма микроРНК при атеросклерозе дополнит наши знания о патогенезе заболевания, а также может иметь практическое применение в областях фармакогеномики, молекулярной эпидемиологии и персонализированной медицины.

1.6 Заключение

Атеросклероз – это многофакторное заболевание, которое имеет высокую медико-социальную значимость. Патоморфологическим субстратом заболевания является атеросклеротическая бляшка, которая отличается гетерогенностью клеточного состава.

К настоящему времени накоплена информация в отношении экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. При атеросклерозе в тканях сонных артерий изменяется экспрессия широкого спектра микроРНК (miR-let-7f, miR-1, -21, -22, -26b, -29b, -10b, -133a, -145, -146a и др.). Эти микроРНК имеют большое количество генов-мишеней, белковые продукты которых участвуют в ангиогенезе, миграции и адгезии клеток, апоптозе, активации иммунного ответа.

Однако механизмы регуляции функциональной активности генов микроРНК остаются малоизученными. Метилирование ДНК может контролировать экспрессию многих генов, в том числе генов микроРНК. В результате исследований EWAS показано, что изменение уровня метилирования ДНК в промоторах генов микроРНК связано с их экспрессией и, тем самым, влияет на риск заболевания. Работы, в которых анализируются изменения уровней метилирования ДНК в области генов микроРНК (miR-10b, miR-23b, локус 14q32 (miR-127, -136, -410, -431, -432 и -433), miR-143 и miR-145) в атеросклеротических бляшках, немногочисленны и проведены в цельных и разных по своей локализации сосудах.

Атеросклероз артерий различных сосудистых бассейнов имеет существенную генетическую компоненту. Многие локусы генома, связанные с клиническими проявлениями атеросклероза, обнаружены в результате GWAS. Однако большинство идентифицированных генетических вариантов расположены в регуляторных регионах генома. Но при этом полиморфизм в структуре микроРНК, может влиять на её функцию и экспрессию. Однонуклеотидные варианты (SNPs) расположены в области последовательности предшественников и зрелых микроРНК, а также в регуляторных элементах, таких как промоторы. Ассоциацию полиморфных вариантов в области генов микроРНК (miR-let-7, miR-

27а, -146а, -196а, -423, -499а, -618) с патологическими фенотипами атеросклероза коронарных и сонных артерий изучали преимущественно с использованием отдельных SNPs в азиатских популяциях и получили противоречивые результаты.

Однако все предыдущие исследования, в основном, проведены в отдельных работах и основаны на анализе какого-то одного молекулярного уровня (экспрессии микроРНК, генетического полиморфизма, метилирования ДНК). Комплексное изучение экспрессии микроРНК, метилирования ДНК и полиморфизма в области генов микроРНК в атеросклеротических бляшках является перспективным в отношении поиска новых маркерных молекул, информативных для оценки тяжести атеросклероза и прогноза его осложнений. С другой стороны, интеграция данных, полученных из разных молекулярных уровней, может обеспечить более полное представление о молекулярных звеньях развития атеросклеротического поражения артерий.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Дизайн исследования, объем и структура материала

Проведение данного исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (№9 от 26.11.2018). Дизайн исследования представлен на Рисунке 3.

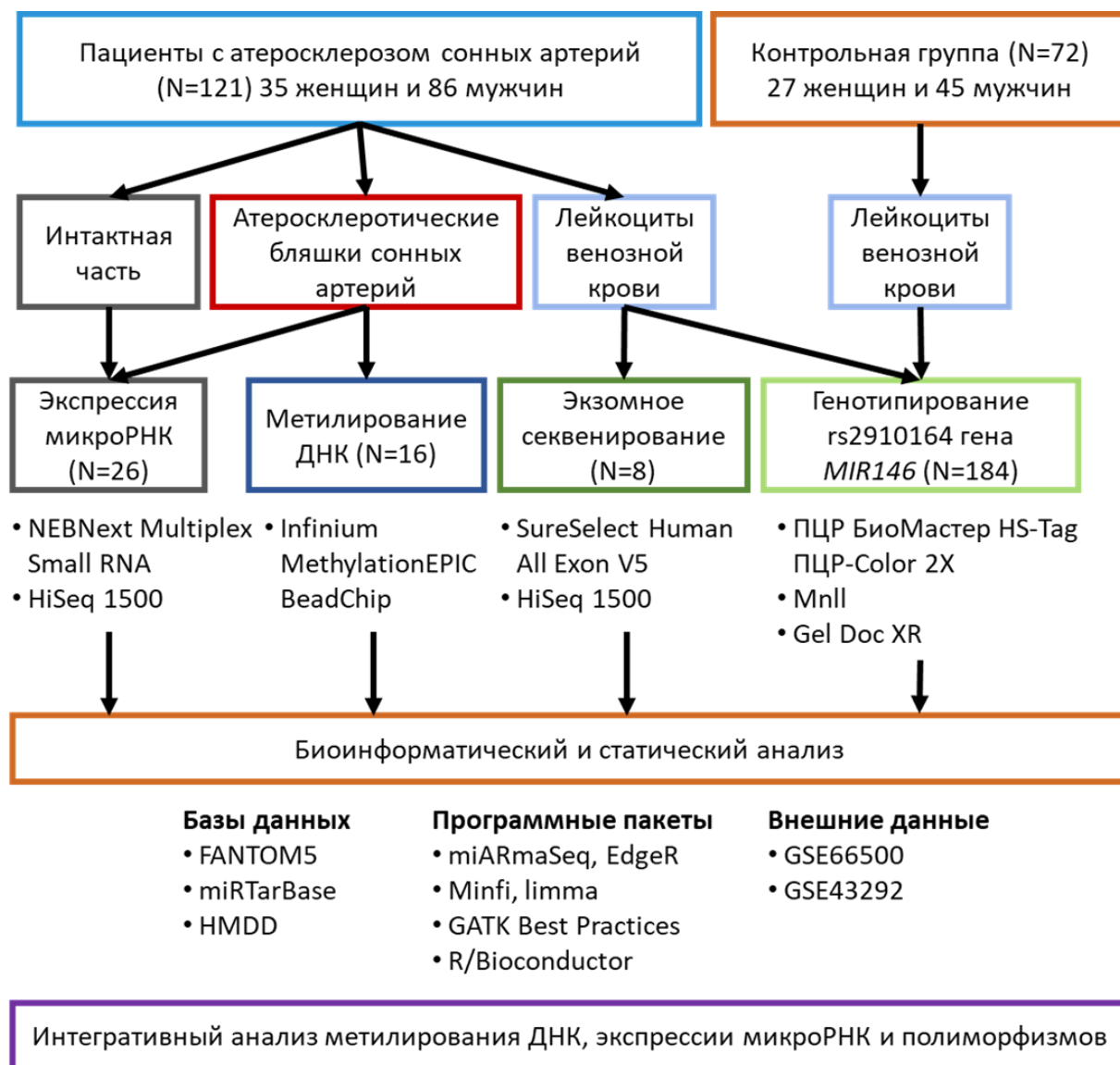


Рисунок 3 – Схема проведения диссертационного исследования.

2.2 Клиническая характеристика пациентов

Для хранения информации о пациентах была создана электронная база данных, содержащая подробную клиническую информацию. Все пациенты подписали добровольное согласие на участие в эксперименте. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и ресурсов биобанка «Биобанк населения Северной Евразии» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

Выборка из 121 пациента с атеросклерозом сонных артерий сформирована на базе НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний (г. Кемерово) и НИИ кардиологии Томского НИМЦ (г. Томск). Медианный возраст пациентов составил 65[60,69] лет, из них 86 (71%) человек были мужчинами (Таблица 5).

Таблица 5 – Клиническая характеристика пациентов, включенных в исследование

Параметры	Пациенты с атеросклерозом сонных артерий (N=121)
Пол (мужчины : женщины)	86:35
Возраст, лет (Q2 [Q1;Q3])	65[60,69]
Индекс массы тела, кг/м ² (Q2 [Q1;Q3])	30[26,33]
Инфаркт миокарда в анамнезе [абс. (%)]	41 (33.9)
ИБС в анамнезе [абс. (%)]	103 (85.1)
ОНМК (ТИА, инсульт) в анамнезе [абс. (%)]	40 (33.1)
Артериальная гипертензия [абс. (%)]	119 (98.3)
Курение [абс. (%)]	73 (60.3)
Сахарный диабет 2 типа [абс. (%)]	29 (24)
Степень стеноза сонной артерии по данным УЗИ % (Q2 [Q1;Q3])	90[80,95]
Глюкоза, ммоль/л (Q2 [Q1;Q3])	6.3[5.5,7.45]
Антикоагулянты/деагреганты [абс. (%)]	116 (95.9)
Антигипертензивные препараты [абс. (%)]	119 (98.3)
Статины [абс. (%)]	116 (95.9)
Противодиабетические препараты [абс. (%)]	29 (24)

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ТИА – транзиторные ишемические атаки, Q – квартиль.

По данным анамнеза 103 (85%) пациентов имели ИБС, 119 (98%) – артериальную гипертензию, 41 (34%) – перенесли инфаркт миокарда, 40 (33%) – острое нарушение мозгового кровообращения. Порядка 95% пациентов принимали хотя бы по одному препарату в каждой из трех групп препаратов (антикоагулянты/дезагрегганты, антигипертензивные, статины). Помимо этого, 29 (24%) пациентов имели сахарный диабет 2 типа. Всем пациентам по показаниям (>65% стеноза каротидных артерий) проведена каротидная эндартерэктомия. Степень стеноза сонной артерии у пациентов по данным УЗИ составила 90 [80,95]%.

Контрольная группа включала 72 относительно здоровых индивидов в отношении сердечно-сосудистой патологии. Их возраст был 69 [67,73] лет, из них 45 (63%) мужчин. Всем обследованным, включенным в контрольную группу, было проведено УЗИ, выявившее начальные стадии атеросклероза сонных артерий (стеноз не превышал 24%), но без гемодинамически значимых нарушений. Кроме того, у всех индивидов из данной группы были в пределах нормы основные биохимические показатели, которые относятся к факторам риска ССЗ (общий холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, глюкоза).

От всех обследуемых получены образцы цельной периферической крови, из лейкоцитов которой выделена ДНК для молекулярно-генетического исследования.

В ходе проведения плановой каротидной эндартерэктомии были получены биоптаты поражённой атеросклерозом сонной артерии (n=21) и подлежащая относительно интактная часть ткани (n=5). Артерии после оперативного вмешательства фрагментировались на равнопредставленные части. Одна часть использовалась для выделения РНК, другая – для гистологического исследования.

Поражённые атеросклерозом сонные артерии были окрашены гематоксилин-эозином с последующим анализом стадии патологического процесса, согласно классификации American Heart Association (AHA) [30]. Согласно результатам гистологического анализа, атеросклеротические бляшки сонных артерий относились ко II типу (n=1), III типу (n=3), IV (n=8), V типу (n=2) и VI (n=7).

2.3 Молекулярно-генетические методы

2.3.1 Выделение нуклеиновых кислот и оценка их качества

Образцы ДНК из лейкоцитов периферической крови получены с помощью фенол-хлороформной экстракции.

В протоколе использованы *следующие реактивы*: 1xSSC (3M NaCl; 0.3M цитрат натрия, pH 7,0), ацетат натрия, SDS (Натрия додецилсульфат), буфер TE (Трис-ацетатный буфер) pH 8.0, хлороформ, фенол, этанол 96%, вода без нуклеаз.

Оборудование и расходные материалы: центрифуга 5810 R (Eppendorf, Германия), 1.5 мл центрифужные микропробирки (свободные от РНКаз).

Подготовка образца проводилась:

1. Размороженную кровь аккуратно перемешать.
2. В микроцентрифужную пробирку к 500 мкл крови добавить дистиллированную воду до конечного объема 1,5 мл. Тщательно перемешать и оставить на 15 минут.

Протокол выделения состоял из следующих этапов:

1. Пробу центрифугировать при 4°C в течение 10 минут с ускорением 8000 об/мин. Супернатант осторожно слить.
2. Осадок клеток отмыть, добавив в пробирку 500 мкл 1xSSC. Аккуратно перемешать.
3. Пробу центрифугировать при 4°C в течение 10 мин. с ускорением 8000 об/мин. Супернатант осторожно слить.
4. К осадку добавить 54 мкл 0.2М ацетата натрия и 6 мкл 10% раствора SDS.
5. Осадок клеток тщательно ресуспензировать.
6. Инкубировать при +37 C в течение 1 часа для прохождения лизиса клеток.
7. К образцу добавить 2 объема буфера TE pH 8.0.
8. Провести экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформом.
9. К образцу добавить 1/10 объема 3М ацетата натрия, pH 5.3, перемешивать и осадить ДНК 2,5 объемами холодного 96% этанола.
10. Пробу центрифугировать при 0°C в течение 15 мин. с ускорением 12000 об/мин. Супернатант слить.
11. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE pH 8.0

Образцы биоптатов тканей сонных артерий вплоть до исследования хранились в парах жидкого азота в растворе RNALater (Qiagen).

В протоколе выделения ДНК из тканей использованы *следующие реактивы*: Буфер-1 (100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 8.0), буфер TE pH 8.0, протеиназа К, SDS , xSSC (3M NaCl; 0.3M цитрат натрия, pH 7.0), ацетат натрия, хлороформ, фенол, этанол 96%, вода без нуклеаз.

Оборудование и расходные материалы включали: центрифуга 5810 R (Eppendorf, Германия), гомогенизатор Minilys с набором для гомогенизации CKMix (Bertin Technologies, Франция), 1.5 мл центрифужные микропробирки (свободные от РНКаз).

Подготовка образца проводилась:

1. Провести гомогенизацию ткани с использованием гомогенизатора Minilys.
2. Гомогенат перенести в микроцентрифужную пробирку и добавить 350 мкл буфера 10 мкл протеиназы К (10 мг/мл) и 40 мкл 10% SDS.

Протокол выделения состоял из следующих этапов:

1. Пробу ресуспендировать и инкубировать 1-2 часа при 55°C, периодически переворачивая пробирку.
2. Охладить пробирку до комнатной температуры.
3. Провести экстракцию ДНК равными объемами фенола, смеси фенол-хлороформ и хлороформом.
4. К образцу добавить 1/10 объема 3М ацетата натрия, pH 5.3, перемешивать и осадить ДНК 2,5 объемами холодного 96% этанола.
5. Пробу центрифугировать при 0°C в течение 15 мин. с ускорением 12000 об/мин. Супернатант слить.
6. Высушить осадок ДНК на воздухе и растворить в 50 мкл буфера TE pH 8.0

В протоколе выделения РНК из тканей сонных артерий использованы *следующие реактивы*: TRIzol, промывочный буфер II, хлороформ, этанол 100%, вода без нуклеаз.

Оборудование и расходные материалы включали: центрифуга 5810 R (Eppendorf, Германия), гомогенизатор Minilys с набором для гомогенизации СКMix (Bertin Technologies, Франция), 1,5 мл центрифужные микропробирки (свободные от РНКаз), колонка Micro Kit PureLink.

Подготовка образца проводилась:

1. Добавить 1 мл TRIzol к 10 мг ткани.
2. Провести гомогенизацию ткани с использованием гомогенизатора Minilys.

Протокол выделения состоял из следующих этапов:

1. Инкубировать гомогенат при комнатной температуре в течение 5 мин.
2. Добавить 0.2 мл хлороформа и встряхивать пробирку вручную в течении 15 сек.
3. Инкубировать при комнатной температуре в течение 2-3 мин.
4. Центрифугировать в течение 15 мин. при >12000 об/мин. и температуре 4°C.
5. Перенести верхнюю фазу в новую пробирку.
6. Добавить равный объём 100% этанола. Перемешать на вортексе.
7. Перевернуть пробирку, чтобы отслоить весь осадок.
8. Перенести в колонку Micro Kit PureLink.
9. Центрифугировать в течение 1 мин при >12000 об/мин. и при комнатной температуре. Избавиться от фильтрата.

10. Добавить 500 мкл промывочного буфера II в центр колонки.
11. Центрифугировать в течение 15 сек. при >12000 об/мин. и при комнатной температуре. Отбросить фильтрат.
12. Повторить пункты 10-11 один раз.
13. Центрифугировать в течение 60 сек. при >12000 об/мин. и при комнатной температуре. Переместите колонку в новую пробирку.
14. Добавить 12-22 мкл воды без нуклеаз в центр колонки.
15. Инкубировать при комнатной температуре в течение 1 мин.
16. Центрифугировать в течение 2 мин при >12000 об/мин. и при комнатной температуре.

Оценка качества и концентрации выделенной ДНК и РНК проведены с помощью спектрофотометра «NanoDrop» (Thermo) и Agilent Bioanalyzer (Agilent), соответственно. Полученные образцы хранились в морозильной камере при $t = -80^{\circ}\text{C}$ вплоть до их исследования.

2.3.2 Приготовление кДНК-библиотек микроРНК и их секвенирование

Экспрессия малых некодирующих РНК оценена с использованием набора для приготовления кДНК-библиотек NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (NEB) с последующим секвенированием на приборе HiSeq 1500 (Illumina).

Очистка образцов проводилась с использованием Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (Illumina). Отбор малых РНК проводили с помощью AMPure XP Bead (Beckman Coulter).

Реактивы: NEBNext буфер для 3'-лигирования, NEBNext смесь ферментов для 3'-лигирования, NEBNext 3'-SR-адаптер, NEBNext 5'-SR-адаптер, NEBNext буфер для 5'-лигирования, NEBNext смесь ферментов для 5'-лигирования, NEBNext SR RT праймер, NEBNext буфер для синтеза первой цепи, Обратная транскриптаза ProtoScript II, Ингибитор РНКазы, LongAmp Taq 2X Master Mix, NEBNext SR праймер, NEBNext индексный праймер 1-12, Monarch PCR and DNA Cleanup Kit, AMPure XP Bead, Вода без нуклеаз, Этанол 100%.

Оборудование и расходные материалы: центрифужные микропробирки, центрифужные фильтры для пробирок, ванна с сухим льдом, термоциклер, магнитный штатив, вортекс.

Протокол включал следующие этапы:

1. Лигирование 3'-SR-адаптера.
2. Гибридизация праймера для обратной транскрипции.
3. Лигирование 5' SR адаптера.
4. Обратная транскрипция.
5. Амплификация по программе (Таблица 6).
6. Отбор малых РНК.

Таблица 6 – Программа амплификации NEBNext SR с индексными праймерами

Название цикла	Температура	Время	Количество циклов
Начальная денатурация	94°C	30 сек.	1
Денатурация	94°C	15 сек.	12
Отжиг	62°C	30 сек.	
Элонгация	70°C	15 сек.	
Финальная элонгация	70°C	5 мин.	1
Холод	4°C	∞	

Оценка качества приготовленных библиотек проводилась с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (Agilent). Секвенирование кДНК-библиотек выполнялось на приборе HiSeq 1500 (Illumina). Данный прибор осуществляет высокопроизводительный анализ, используя метод секвенирования путем синтеза и мостиковую ПЦР. Остановка синтеза происходит после присоединения каждого нуклеотида, что обеспечивает высокую точность прочтений. Данный подход позволяет получать большой объем информации, генерируя миллионы одновременных прочтений, покрывающих весь спектр последовательностей малых РНК. Запуск прибора осуществлялся в режиме однонаправленных прочтений с длиной в 50 нуклеотидов.

2.3.3 Бисульфитная конверсия ДНК и оценка уровня метилирования ДНК на микрочипах

Оценка уровня метилирования ДНК выполнялась с помощью микрочипов Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina). Данная платформа позволяет проанализировать уровень метилирования больше 870000 CpG-сайтов. Метилирование ДНК измеряется с помощью количественного «генотипирования» ДНК после ее бисульфитной модификации.

Бисульфитная модификация ДНК была проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research), согласно протоколу производителя с некоторыми модификациями.

При этом ДНК в количестве не менее 1000 нг инкубировали с конвертирующим реагентом (бисульфитом натрия) в амплификаторе Терцик (ДНК-технология) на протяжении 16 циклов в режиме: 95°C – 30 сек., 50°C – 60 мин. Далее проводили отмывку конвертированной бисульфитом ДНК на специальных колонках из набора.

Дальнейшие этапы были выполнены согласно протоколу Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide (Illumina). Конвертированную ДНК подвергали денатурации и нейтрализации с последующей изотермической полногеномной амплификацией в течение ночи (Рисунок 4). Затем

осуществляли ферментативную фрагментацию продуктов амплификации, пересаживание в изопропанол и ресуспендирование ДНК.

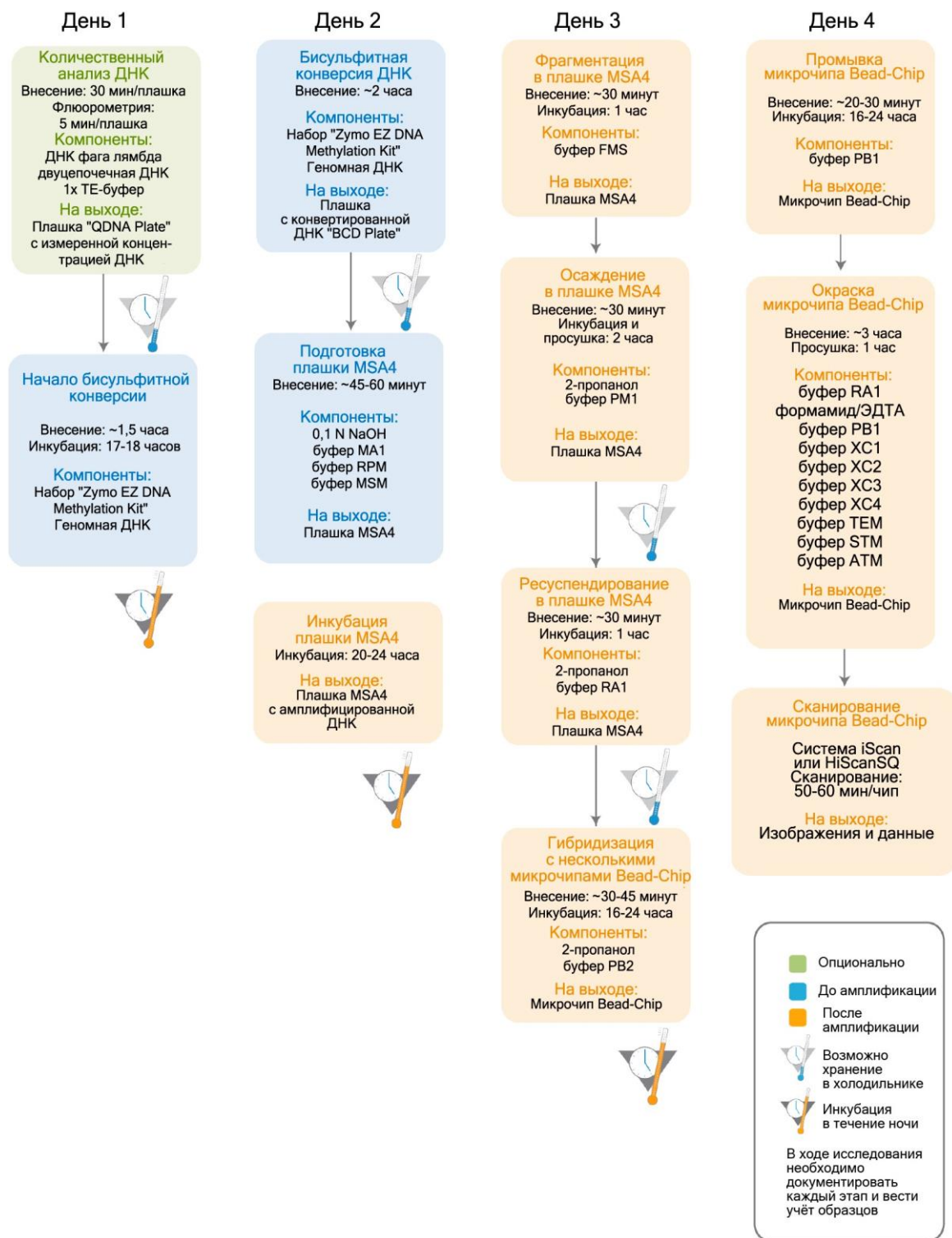


Рисунок 4 – Протокол анализа метилирования ДНК на микрочипах фирмы Illumina (Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide).

Далее производилась гибридизация ресупендированных образцов ДНК на микрочипах Infinium MethylationEPIC BeadChip в термостате Illumina Hybridization Oven в течение 20 часов. В процессе гибридизации фрагментированная ДНК отжигалась на локус-специфичных зондах, иммобилизованных на бусинах микрочипа, а негибридизовавшаяся или неспецифично гибридизовавшаяся ДНК была отмыта. Далее производилось ферментативное удлинение зондов на одно основание, специфичное для статуса метилирования CpG-сайта, с использованием специальных нуклеотидов-терминаторов, которые затем метились флуоресцентным красителем.

Детекция меченых зондов осуществлялась с помощью лазерного сканера микрочипов HiScan System (Illumina), который позволяет получать снимки свечения флюорофоров в высоком разрешении.

Изображения и первичные файлы с информацией о зарегистрированных сигналах (IDAT-файлы) анализировались с помощью программного обеспечения GenomeStudio software (Illumina), в котором была проведена фоновая коррекция сигнала. Затем данные экспортировались для биоинформатического анализа.

2.3.4 Приготовление экзомных ДНК-библиотек и их секвенирование

Для анализа генетических вариантов в области генов микроРНК в ДНК лейкоцитов периферической крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий было проведено экзомное секвенирование. Для приготовления ДНК-библиотек использовали набор SureSelect Human All Exon V5 (Agilent) с последующим секвенированием в режиме 2x150 п.н. на приборе HiSeq 1500 (Illumina). Первичные данные хранятся в репозитории NCBI BioProject, PRJNA758796 [153].

Для приготовления ДНК-библиотек использовался набор SureSelectXT2 Target Enrichment System for Illumina Paired-End Multiplexed Sequencing (Agilent Technologies).

Используемые реактивы включали:

Low-TE, вода свободная от нуклеаз, SureSelect End Repair Enzyme Mix, SureSelect End Repair Nucleotide Mix, SureSelect dA-Tailing Master Mix, SureSelect Ligation Master Mix, SureSelect Pre-capture Indexed Adaptor solution, XT2 Primer Mix, Herculase II PCR Master Mix, 70% этанол, Оборудование и расходные материалы были представлены: 1,5-мл пробирки LoBind, прибор для фрагментации Covaris, Covaris microTUBE, 96-луночный планшет SureCycler, 8800 магнитный сепаратор, центрифуга, вортекс, термоциклер, 2100 Bioanalyzer DNA 1000 Assay.

Протокол включал следующие этапы:

1. Фрагментация ДНК на приборе Covaris (Таблица 7).

Таблица 7 – Протокол фрагментации ДНК для прибора Covaris

Настройки	Значения
Коэффициент нагрузки	10%
Пиковая мощность	175
Количество циклов	200
Время обработки	360 сек.
Температура	4°- 8°C

2. Восстановление концов фрагментов.
3. Очистка образца с помощью шариков AMPure XP Bead.
4. Присоединение dA-хвоста к 3'-концу фрагментов ДНК.
5. Лигирование адаптеров.
6. Очистка проиндексированной ДНК с помощью шариков AMPure XP.
7. Амплификация образца по программе (Таблица 8).

Таблица 8 – Программа амплификации

Количество циклов	Температура	Время
1	98°C	2 мин.
5	98°C	30 сек.
	60°C	30 сек.
	72°C	1 мин.
1	72°C	10 мин.
1	4°C	Держать

8. Очистка амплифицированной ДНК-библиотеки с помощью AMPure XP Bead (Beckman Coulter).

Оценка качества приготовленных ДНК-библиотек проводилась с использованием DNA 1000 Assay на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent).

Секвенирование ДНК-библиотек проводилось на приборе HiSeq 1500 (Illumina) в режиме парноконцевых прочтений с длиной в 150 нуклеотидов.

2.3.5 Подтверждающие исследования генетических вариантов

Анализ полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* проведен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ). За основу была взята методика, описанная в статье Yamashita J. и соавт. (2013) [154].

Протокол анализа полиморфного варианта rs2910164

Реактивы включали: Прямой праймер (5'-GTATCCTCAGCTTTGAGAACT-3'), обратный праймер (5'-CTCACAGGAAGTCACTC-3'), БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color 2X (Биолабмикс, Россия), буфер G (10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25 C), MgCl₂, NaCl, DTT (Дитиотреитол), BSA (Бычий сывороточный альбумин), 3% агарозный гель, эндонуклеаза рестрикции MnlI (СибЭнзим, Россия), бромистый этидий, вода без нуклеаз.

Оборудование и расходные материалы были представлены: 96-луночный микропланшет, термоциклер ProFlex (ThermoFisher Scientific, США), электрофоретическая камера, гель-документирующая система Gel Doc XR+ (BioRad, США).

Приготовление реакционных смесей: Реакционная смесь для ПЦР (20 мкл): 8,2 мкл деионизованной воды; 10 мкл готовой смеси для ПЦР БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color 2X; по 0,4 мкл прямого и обратного праймеров; 1 мкл геномной ДНК. Рестрикционная смесь: 1,0 мкл буфера G; 10 mM MgCl₂; 50 mM NaCl; 1 mM DTT; 0,1 мкл BSA; 0,4 мкл вода без нуклеаз, 0,5 мкл эндонуклеазы MnlI (соответствует 5 е.а. фермента).

Протокол включал следующие этапы:

1. Амплификация анализируемого фрагмента ДНК по программе (Таблица 9).

Таблица 9 — Программа амплификации для анализа полиморфного варианта rs2910164

Название цикла	Температура	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95°C	5 мин.	1
Денатурация	95°C	15 сек.	40
Отжиг	60°C	15 сек.	
Элонгация	72°C	20 сек.	
Финальная элонгация	72°C	5 мин.	1

2. Гидролиз ПЦР-продукта и его детекция.

При наличии нуклеотида G rs2910164 гена *MIR146A*, обработка ПЦР-продукта (218 п.н) ферментом рестрикции MnlI приводит к его разделению на три фрагмента длиной 15 п.н., 77 п.н.

и 126 п.н. Однако при замене нуклеотида G на C появляется дополнительный сайт рестрикции и ПЦР-продукт разделяется на четыре фрагмента длиной 15 п.н., 45 п.н., 32 п.н. и 126 п.н., которые детектируются при электрофорезе в 3% агарозном геле.

2.3.6 Используемые электронные ресурсы и базы данных

Для проведения анализа были привлечены данные из внешних общедоступных баз. Данные об уровне экспрессии микроРНК в различных тканях человека были получены из базы FANTOM5 [34]. Информация о взаимодействии микроРНК с генами-мишенями взята из базы miRTarBase [155]. Из баз HMDD [108], miRNet [109], miRwayDB [110], получена информация о связи микроРНК с развитием различных патологий, в том числе с атеросклерозом. Данные о частотах полиморфных вариантов в популяциях мира были извлечены из базы gnomAD [156]. Из базы данных GEO (в том числе с использованием инструмента GEO2R) [157] получены первичные данные для двух микрочиповых экспериментов:

1. Уровень метилирования в атеросклеротических бляшках сонных артерий, полученных от пациентов с/без инсульта в анамнезе (n=38, Infinium HumanMethylation450 BeadChip, GSE66500) [56].
2. Уровень экспрессии мРНК в образцах сонных артерий в сравнении с макроскопически неповреждёнными артериями (n=64, Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array, GSE43292) [158].

2.3.7 Биоинформатический и статистический анализ

Биоинформатическая обработка данных секвенирования микроРНК выполнена с помощью набора программ miARma-Seq [159]. Адаптеры обрезались с использованием программы cutadapt [160]. Выравнивание последовательностей проводили на сборку генома человека версия GRCh38 (hg38) с использованием алгоритма Bowtie1. Покрытие микроРНК рассчитывали в соответствии с miRbase v. 22 [100]. В анализ вошли микроРНК, для которых уровень экспрессии был более 10 CPM (количество прочтений на миллион, Count Per Million), хотя бы в одном образце. Дифференциальная экспрессия микроРНК оценивалась с использованием статистического пакета EdgeR. Порогом для фильтрации дифференциально экспрессированных микроРНК выбран $|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$, как оптимальный, для минимизации ошибки второго рода, так как методы последующего статистического и интегративного анализа устойчивы к ошибкам первого рода [161].

Биоинформатическая обработка данных метилирования ДНК проведена в программной среде R с использованием пакетов minfi [162]. Из всех проб, расположенных на микрочипе

Infinium MethylationEPIC, были исключены из дальнейшего анализа пробы, локализованные в области полиморфных вариантов и имеющие частоту минорного аллеля (MAF)>0,05, расположенные на половых хромосомах, а также имеющие низкий уровень детекции. В результате дальнейший анализ проводился для 795729 CpG-сайтов, из которых 8181 CpG-сайтов приходится на регион – 3 кб в области генов микроРНК.

Биоинформатическая обработка данных экзомного секвенирования выполнена согласно алгоритму GATK Best Practices [163] для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, а также небольших инсерций и делеций. Предикция функциональной значимости SNPs в отношении экспрессии микроРНК выполнена с помощью программы miRVaS.

Функциональная аннотация результатов секвенирования микроРНК проводилась с использованием веб-инструментов WebGestalt [164] и TAM2 [165].

Интегративный и статистический анализ выполнен в программной среде R. Статистический анализ результатов измерения уровня метилирования ДНК и экспрессии микроРНК проведён с использованием линейных моделей, реализованных в пакете limma [166]. Кластерный анализ сделан с использованием пакета pvclust [167], а снижение размерности данных - в пакете factextra, для этого применялся метод главных координат [168]. Поиск модулей коэкспрессии микроРНК проводился с использованием пакета WGCNA [169].

Деконволюция клеточного состава была реализована с использованием пакета DeconRNASeq [170] для данных микроРНК и с использованием пакета EpiDISH [171] для данных метилирования ДНК.

Для сравнительного анализа отдельных групповых различий применялись точный критерий Фишера и критерий Хи-квадрат (χ^2) в зависимости от размера выборки. Расчёт данных критериев проведён с использованием программы MULTISNPR [172].

Множественное тестирование статистических гипотез выполнено с поправкой Бенджамини-Хохберга и статистически значимыми считались результаты при достигнутом уровне значимости $FDR < 0.05$.

Визуализация результатов проведена с использованием пакета ggplot2 [173].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Анализ экспрессии микроРНК в сонных артериях

3.1.1 Оценка профиля экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий

Для оценки профиля экспрессии микроРНК в атеросклеротически поражённой и интактной подлежащей части сонной артерии использованы парные образцы от 5 пациентов с клинически выраженным атеросклерозом (Таблица 10).

Таблица 10 – Клиническая характеристика пациентов с атеросклерозом сонных артерий

Параметры	Пациент ID				
	124	127	131	133	134
Возраст	70	61	60	62	43
Ожирение	-	-	-	-	+
Курение	+	-	-	+	+
Инфаркт миокарда в анамнезе	-	+	-	+	-
Отягощенность ИБС в родословной	-	+	+	-	-
Поражение периферических артерий в анамнезе	+	-	-	-	-
Антикоагулянты/дезагреганты	-	+	-	+	-
Антигипертензивные препараты	+	+	+	+	-
Статины	+	+	+	+	-
Сонная артерия, на которой проводилась операция	Л	П	П	П	П
УЗИ/Ангиография/МСКТ сонных артерий (% стеноза)	93%	80%	65%	70%	89%
Гистологическая стадия	V	IV	IV	IV	III

Примечание: МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография, Л – левая сонная артерия, П – правая сонная артерия.

Все пациенты были мужчинами, их возраст составил 43-70 лет. Степень стеноза сонных артерий варьировала от 65 до 93%. В анамнезе у всех пациентов не было ТИА/ОНМК и сахарного

диабета 2 типа. Гистологически атеросклеротические бляшки сонных артерий принадлежали к III-V типам. У трех пациентов отмечалось также атеросклеротическое поражение коронарных (ИМ в анамнезе) или периферических артерий. Четыре пациента из пяти принимали хотя бы один лекарственный препарат из групп статинов, антигипертензивных препаратов и антикоагулянтов/дезагрегантов.

В результате секвенирования малых некодирующих РНК выявлено, что в среднем на один образец приходилось 13 миллионов прочтений, из них в среднем 7,2 миллиона относилось к микроРНК. Статистически значимых различий в количестве прочтений, приходящихся на парные пораженные атеросклерозом и интактные образцы, не наблюдалось. После фильтрации данных секвенирования по качеству, в дальнейший анализ вошли микроРНК, для которых уровень экспрессии был более 10 CPM хотя бы в одном образце.

Всего в образцах артерий обнаружено 352 (18%) из 1917 известных микроРНК человека, описанных в базе miRbase v. 22. Наиболее высоко экспрессирующимися микроРНК во всех образцах были miR-21-5p ($\log_2\text{CPM}=17.17$) и miR-143-3p ($\log_2\text{CPM}=17.32$). Экспрессия данных микроРНК суммарно составляет 29% в интактных тканях и 46% в атеросклеротических бляшках сонных артерий от всех экспрессирующихся микроРНК соответственно.

По первой координате PCA, объясняющей большую часть (56%) общей дисперсии всего массива данных, образцы атеросклеротических бляшек сонных артерий (БСА) хорошо дистанцируются от их относительно интактной части (ИСА; Рисунок 5а). Кластеризация образцов по уровню экспрессии микроРНК согласуется с результатами анализа, полученного с помощью метода PCA (Рисунок 5б). Данный результат, скорее всего, объясняется существующей тканевой специфичностью экспрессии микроРНК.

Таким образом, у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий образцы атеросклеротических бляшек и подлежащих относительно интактных тканей дифференцируются по уровню экспрессии 352 микроРНК. Наиболее высоко экспрессирующимися микроРНК в тканях сонных артерий являются miR-21-5p и miR-143-3p.

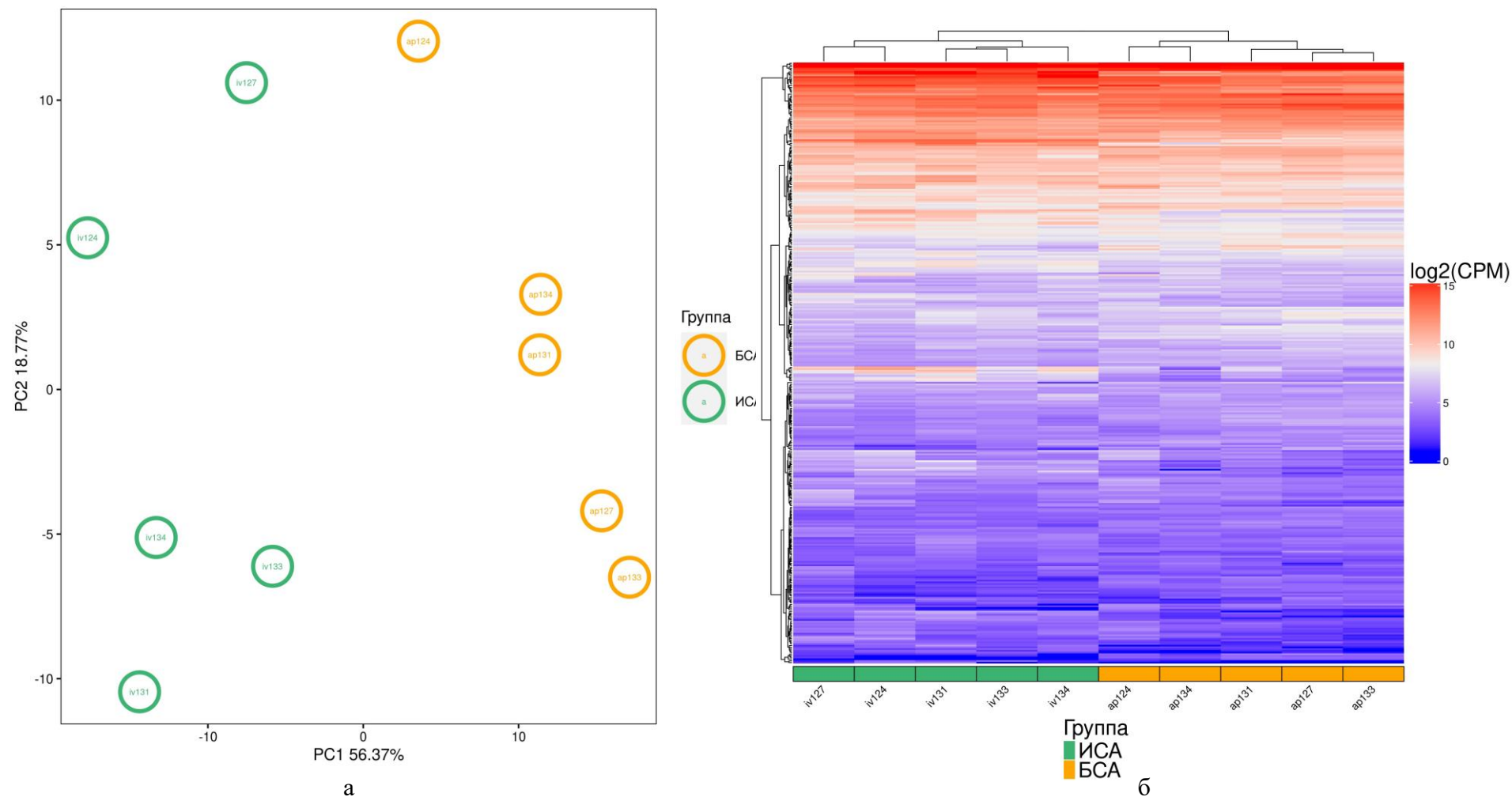


Рисунок 5 – а) Диаграмма расположения исследованных образцов в пространстве первых двух компонент, полученных на основании уровней экспрессии микроРНК в сонных артериях с помощью метода главных координат (РСА). б) Тепловая карта уровней экспрессии микроРНК в сонных артериях. Примечание: БСА - атеросклеротические бляшки сонных артерий, ИБС - относительно интактная часть сонных артерий.

3.1.2 Анализ дифференциальной экспрессии микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий

При сравнении уровней экспрессии микроРНК между образцами атеросклеротических бляшек и относительно интактными частями сонных артерий выявлено 125 дифференциально-экспрессирующихся микроРНК ($|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$; Приложение А). Из них 54 (44%) микроРНК имели повышенную экспрессию в пораженной атеросклерозом сонной артерии по сравнению с ее интактной частью, а 71 (56%) микроРНК — пониженную (Рисунок 6).

Спектр 125 дифференциально-экспрессированных микроРНК, выявленных в настоящем исследовании, был сопоставлен с данными базы HMDD, которая содержит информацию об экспериментально подтвержденных ассоциациях микроРНК с заболеваниями. Для проведения сравнения обозначения микроРНК сокращены до имени семейства. Таким образом, спектр дифференциально-экспрессированных микроРНК, выявленных в настоящем исследовании, уменьшился до 109 уникальных обозначений, а в базе HMDD – до 1059 микроРНК.

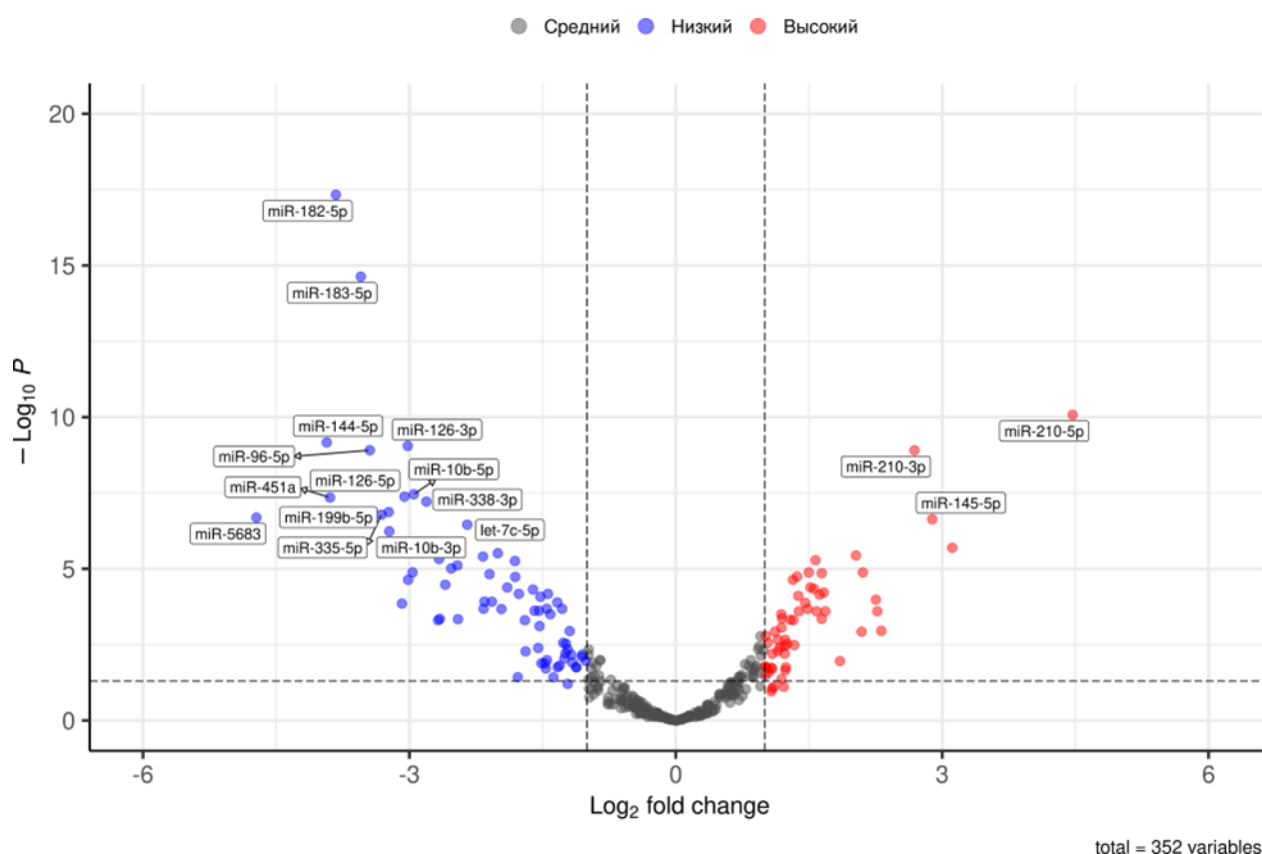


Рисунок 6 – Диаграмма рассеяния разности экспрессии микроРНК между образцами атеросклеротических бляшек (БСА) и интактными частями сонных артерий (ИСА).

Примечание: Точки отображают анализируемые микроРНК, пунктирные линии – принятые пороговые значения для уровня значимости ($FDR=0.05$) и показателя разности экспрессии микроРНК ($|\log_2FC|=1$).

Согласованное изменение

miR-100	miR-210
miR-133a	miR-34a
miR-133b	miR-155
miR-22	miR-193a
miR-146a	

Согласованное изменение

miR-10b
miR-139
miR-338
miR-486

Разнонаправленное изменение

miR-1

Разнонаправленное изменение

miR-19b
miR-143
miR-145

Наши данные

Статьи

Экспрессия микроРНК (↑)

Экспрессия микроРНК (↓)

Экспрессия микроРНК (↑)

Экспрессия микроРНК (↓)

1, 3, 4, 9

Рисунок 7 – Диаграммы Эйлера-Венна, указывающие на совпадения между списками дифференциально-экспрессированных микроРНК, полученными в данном исследовании и в публикациях [43; 46; 113; 114; 116; 117]. Стелками указано направление изменения уровня экспрессии микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и относительно интактных частей сонных артерий.

С публикациями по обозначениям пересекалась 61 микроРНК, что составило 17% из всех обнаруженных микроРНК в сонных артериях. Из них 19 микроРНК показывали статистически значимое изменение экспрессии в нашем исследовании и хотя бы в одной из анализируемых статей. Большая часть микроРНК (n=13, 68%) характеризовалась согласованным изменением уровней экспрессии в нашей работе и в публикациях. Только 4 микроРНК (miR-1, miR-19b, miR-143, miR-145) имели разнонаправленное изменение экспрессии в нашем исследовании по сравнению с данными других исследований [43; 46; 113].

Следует отметить, что при интерпретации результатов экспрессии двух микроРНК (miR-29b и miR-26b) в тканях сонных артерий возникли противоречия. Это обусловлено тем, что в нашем исследовании данные микроРНК демонстрировали разнонаправленное изменение экспрессии в зависимости от цепи с которой они происходят (miR-29b-2-5p, miR-29b-3p и miR-26b-3p, miR-26b-5p), а в привлеченных к рассмотрению публикациях отсутствовала такая информация.

3.1.3 Характеристика спектра дифференциально-экспрессирующихся микроРНК между клетками атеросклеротических бляшек и подлежащих интактных частей сонных артерий

Функциональная аннотация микроРНК, различающихся по уровню экспрессии между клетками атеросклеротических бляшек и относительно интактных частей сонных артерий, проведена с использованием веб-инструмента TAM 2.0 [165].

В результате выявлено, что 71 микроРНК, которые имели снижение экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих интактных частей сонных артерий, статистически значимо связаны с 5 различными категориями («Болезнь», «Функция», «Тканевая специфичность», «Факторы транскрипции», «Семейство микроРНК»; Рисунок 8).

В частности, в категории «Болезнь» 10 микроРНК ассоциированы с миелоидным лейкозом, 60 – с гепатоцеллюлярной карциномой и 20 – с мерцательной аритмией.

В категориях «Функция» и «Тканевая специфичность» выявлена связь с нейротоксичностью (10 микроРНК) и мозжечком (19 микроРНК), соответственно. Скорее всего, это отражает плеiotропное действие микроРНК и возможное их участие в регуляции нейрогенеза.

Экспрессия 9 и 15 микроРНК была связана с транскрипционными факторами – ERS1 и E2F1, соответственно. Эстрогены считаются протективным фактором в отношении риска развития атеросклероза. По-видимому, существует взаимосвязь между широким спектром микроРНК и ESR1 (рецептор эстрогенов) при данном патологическом состоянии. В свою очередь, E2F1 участвует в регуляции клеточного цикла и может опосредовать как пролиферацию, так и апоптоз клеток, оба этих процесса активно присутствуют в атеросклеротической бляшке.

Шесть микроРНК (miR-106a, miR-106b, miR-17, miR-18a, miR-20a, miR-20b) относились к семейству miR-17.

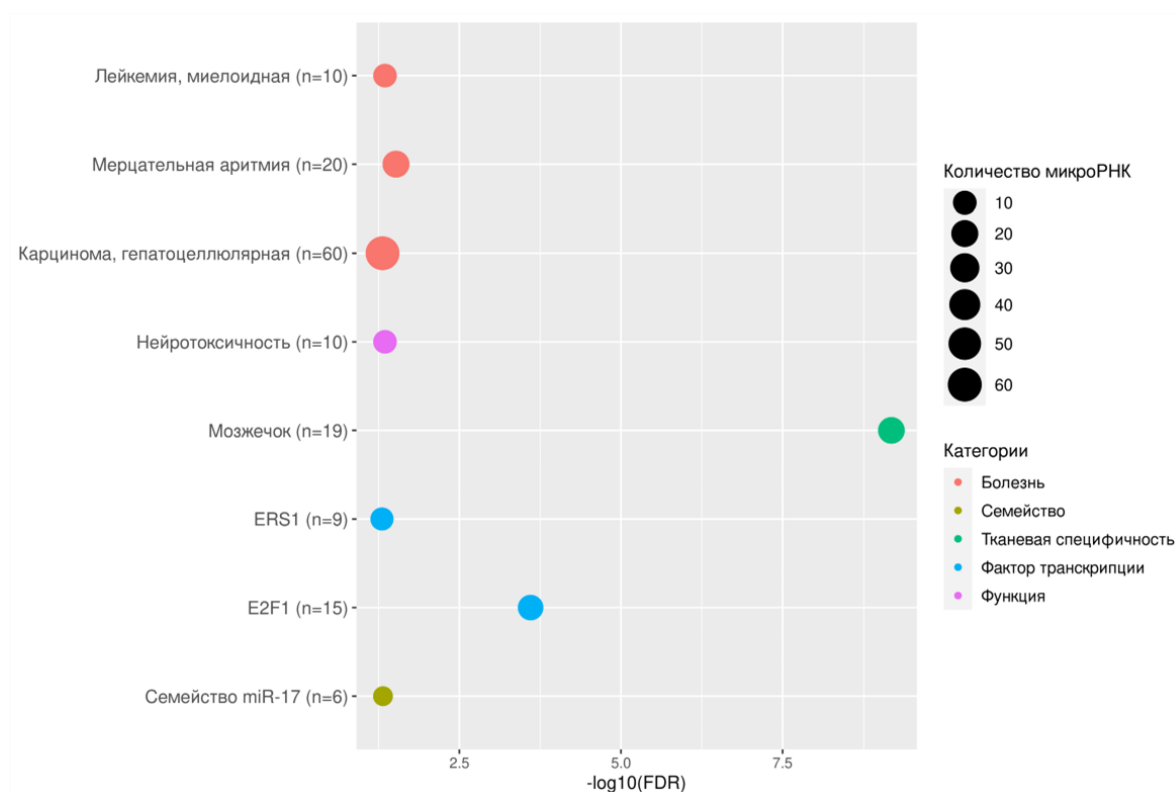


Рисунок 8 – Основные функциональные категории, которые характеризуют микроРНК со снижением экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих intactных частей сонных артерий.

В свою очередь 54 микроРНК, которые демонстрируют повышение экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих intactных частей сонных артерий, статистически значимо связаны с 7 различными категориями («Болезнь», «Функция», «Тканевая специфичность», «Клеточная специфичность», «Факторы транскрипции», «Кластер микроРНК», «Семейство микроРНК»; Рисунок 9).

В категории «Болезнь» представлено 17 нозологий из которых 8 были связаны с заболеваниями сердечно-сосудистой системы и мышц (аневризма сосудов головного мозга – 11 микроРНК, дистальная миопатия – 4 микроРНК, заболевания сердца – 9 микроРНК, синдром удлиненного интервала QT – 4 микроРНК, дистрофия Дюшенна – 5 микроРНК, лицевая и плечевая мышечная дистрофия – 6 микроРНК, скелетно-мышечные аномалии – 4 микроРНК, вентрикулярная тахикардия – 5 микроРНК). Скорее всего, это демонстрирует связь данных микроРНК с гладкомышечным компонентом стенки сосуда. Дополнительно это подтверждается тем, что категории «Функция» и «Тканевая специфичность» представлены такими наименованиями, как повреждение мышц – 5 микроРНК, развитие сердца – 5 микроРНК, сердце

и мышцы – 5 микроРНК, при этом 4 фактора транскрипции также были связаны с развитием миоцитов (MYOG, MYOD, MYF5, MRF4).



Рисунок 9 – Основные функциональные категории, которые характеризуют микроРНК с увеличением экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих intactных частей сонных артерий.

Также в категории «Болезнь» были представлены онкологические заболевания (карцинома полости рта – 10 микроРНК, увеальная меланома – 6 микроРНК, карцинома пищевода – 17 микроРНК, хондрома – 8 микроРНК). Это в свою очередь может отражать влияние микроРНК на пролиферацию клеток в атеросклеротических бляшках, а также хондроцитарную дифференцировку гладкомышечных клеток, которая способствует кальцификации атеросклеротической бляшки [174]. Данный факт подтверждается наличием в категории «Функция» наименований «Развитие хондроцитов» – 9 микроРНК, «Ремоделирование

внеклеточного матрикса» – 4 микроРНК и в категории «Факторы транскрипции» трёх факторов, ассоциированных с клеточным циклом и опухолевым процессом (TP73, TNFSF12, SMAD4).

Инфекционные и воспалительные заболевания в количестве 4 нозологий также присутствовали в категории «Болезнь» (воспаление раны – 5 микроРНК, инфекция микобактерией туберкулёза – 6 микроРНК, сепсис – 10 микроРНК, волчаночный нефрит – 6 микроРНК), что в свою очередь может отражать влияние микроРНК на воспалительный процесс, протекающий в атеросклеротической бляшке. Более того среди выявленных функциональных категории присутствовали макрофаги и моноциты – 4 микроРНК и путь передачи Tollподобных рецепторов – 5 микроРНК.

Поликистоз почек – 6 микроРНК, последнее наименование в категории «Болезнь», объяснить наличие которого и его связь с атеросклерозом проблематично по причине слабой изученности патогенеза данного заболевания, предполагаемой причиной которого считается нарушения на эмбриональном этапе развития. Однако функциональные нарушения почек являются одной из важных компонент заболеваний сердечно-сосудистого континуума, включающего атеросклеротическое поражение сосудов.

Три микроРНК (miR-133a-1, miR-133a-2, miR-133b) относились к семейству miR-133, а ещё три (miR-99b, let-7e, miR-125a) входили в кластер miR-99b.

Для 107 из выявленных в настоящем исследовании дифференциально-экспрессированных микроРНК в базе данных miRTarBase определен хотя бы один ген-мишень, имеющий высокий уровень экспериментальной доказательности. Обнаружено, что 107 дифференциально-экспрессированных микроРНК регулируют 1371 ген. МикроРНК со сниженной экспрессией в клетках атеросклеротических бляшек интактных частей сонных артерий, регулируют 855 генов, а микроРНК с увеличением уровня экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек связаны с 765 генами. Следует отметить, что 249 (18%) генов регулируются микроРНК, которые имеют разнонаправленное изменение экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Функциональная аннотация белковых продуктов генов-мишеней по базам GO, KEGG, Reactome, Disgenet, DrugBank позволила выявить также 20 различных биологических процессов и заболеваний, в которые вовлечены гены, регулируемые микроРНК, которые демонстрируют снижение уровня экспрессии в атеросклеротической бляшке сонной артерии. Среди 2216 различных биологических процессов и заболеваний для генов, которые регулировались микроРНК, демонстрирующими разнонаправленное изменение экспрессии, были пролиферация ГМК и эндотелиальных клеток, а также атеросклероз, сахарный диабет 2 типа, воспаление, ишемия головного мозга (Рисунок 10).

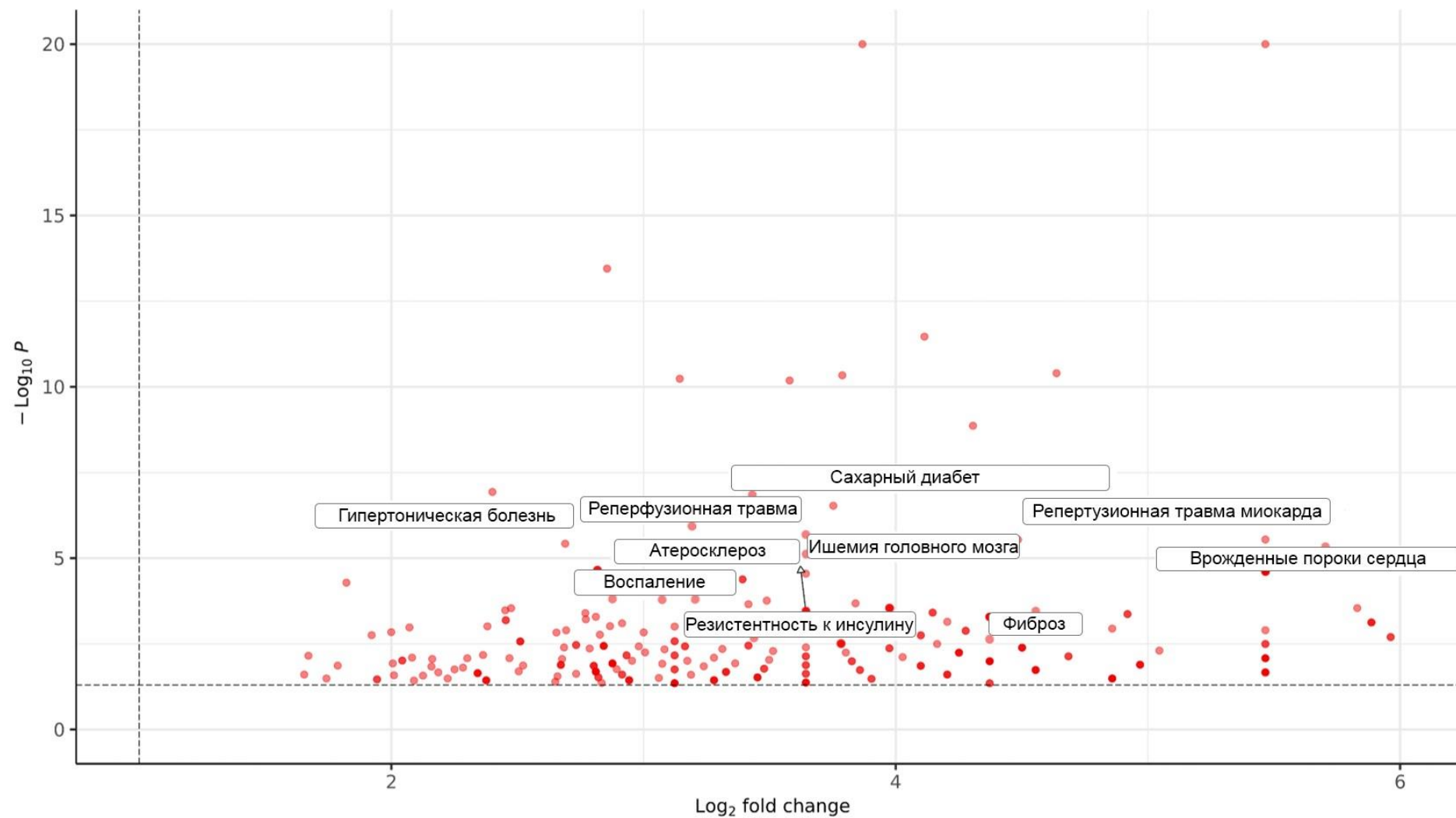


Рисунок 10 – Функциональная аннотация генов-мишеней микроРНК, демонстрирующей разнонаправленное изменение экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих intactных частей сонных артерий, согласно базе данных Disgenet.

3.1.4 Деконволюция клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК

Методика деконволюции сигналов экспрессии по типам клеток позволяет оценить клеточный состав исследуемого образца ткани по уровням экспрессии РНК или метилирования ДНК. Это помогает решить проблему сложности интерпретации результатов, поскольку патологический процесс может изменять не только функциональное состояние клеток, но и собственно клеточный состав ткани.

Деконволюция – это набор статистических методов, которые позволяют восстановить информацию о соотношении различных типов клеток в образце ткани. Алгоритмы деконволюции классифицируются по типу используемых данных (экспрессия мРНК или метилирование ДНК), а также по необходимости использования референсного набора данных с информацией, полученной из образцов отдельных клеточных линий. Однако у метода деконволюции существуют технические ограничения.

Максимальная точность и разрешающая способность метода зависит от количества определяемых проб. Эта особенность ограничивает возможность использования деконволюции к данным микроРНК секвенирования, поскольку в одном эксперименте удастся определить в десятки и сотни раз меньше маркеров, чем при исследовании метилирования ДНК или экспрессии мРНК. Но, созданные к настоящему времени обширные базы данных по экспрессии микроРНК в различных клетках [34] и новые алгоритмы биоинформатического анализа данных потенциально могут преодолеть эту проблему после соответствующей оптимизации.

Разработанный алгоритм деконволюции клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК включал подготовку референсных паттернов экспрессии микроРНК клеточных линий из проекта FANTOM5 [34] и пакет DeconRNASeq [170], предназначенный для клеточной деконволюции тканей на основе экспрессии мРНК. В ходе работы данный пакет был адаптирован для работы с экспрессией микроРНК [175].

Для подготовки референсного набора данных экспрессии микроРНК клеточных линий использовались данные из атласа экспрессии микроРНК проекта FANTOM5, в частности, таковые для эндотелиальных клеток артерий (ЭК, n=9), фибробластов аорты (ФБ, n=3), гладкомышечных клеток артерий (ГМК, n=9), макрофагов (МФ, n=3), нейтрофилов (НФ, n=3), В-клеток (n=4), Т-клеток (CD8- и CD4-, n=6) и NK-клеток (n=3; Приложение Б).

В результате использования разработанного алгоритма деконволюции клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК, выявлено, что ГМК+ФБ (37-52%), НФ (31-35%) и В-клетки (17-30%) составляют существенную долю клеток в интактных частях сонных артерий, а ЭК (0-0.1%) и Т- и NK-клеточный компонент (0.2-1%) представлены минорно (Рисунок 11).

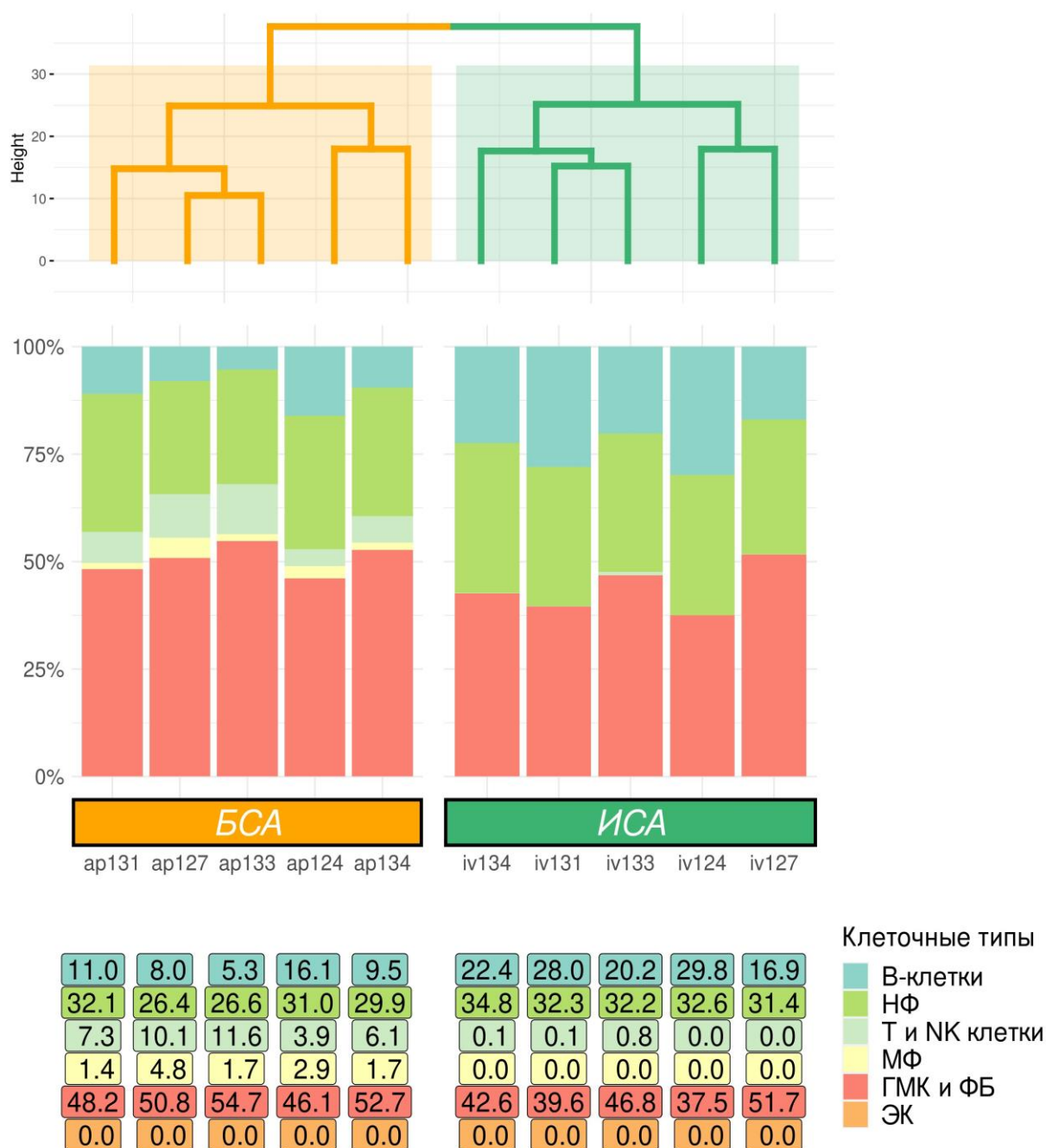


Рисунок 11 – Кластеризация (верхний) и относительные доли клеток (средний и нижний) на основании профилей экспрессии микроРНК в образцах атеросклеротических бляшек (БСА) и интактных частей сонных артерий (ИСА). Примечание: НФ - нейтрофилы, МФ - макрофаги, ГМК и ФБ - гладкомышечные клетки и фибробласты, ЭК - эндотелиальные клетки.

Атеросклеротические бляшки характеризовались более высокой биоинформатически прогнозируемой долей Т- и НК-клеток (4-12%) и меньшим процентом В-клеток (5-16%). Макрофагальный компонент (1-5%) обнаруживался только в пораженных атеросклерозом сонных артериях. Прогнозируемые доли других клеточных компонент значительно не различались между группами и составляли: ГМК+ФБ (46-55%), НФ (26-32%), ЭК (0-0.1%) [175].

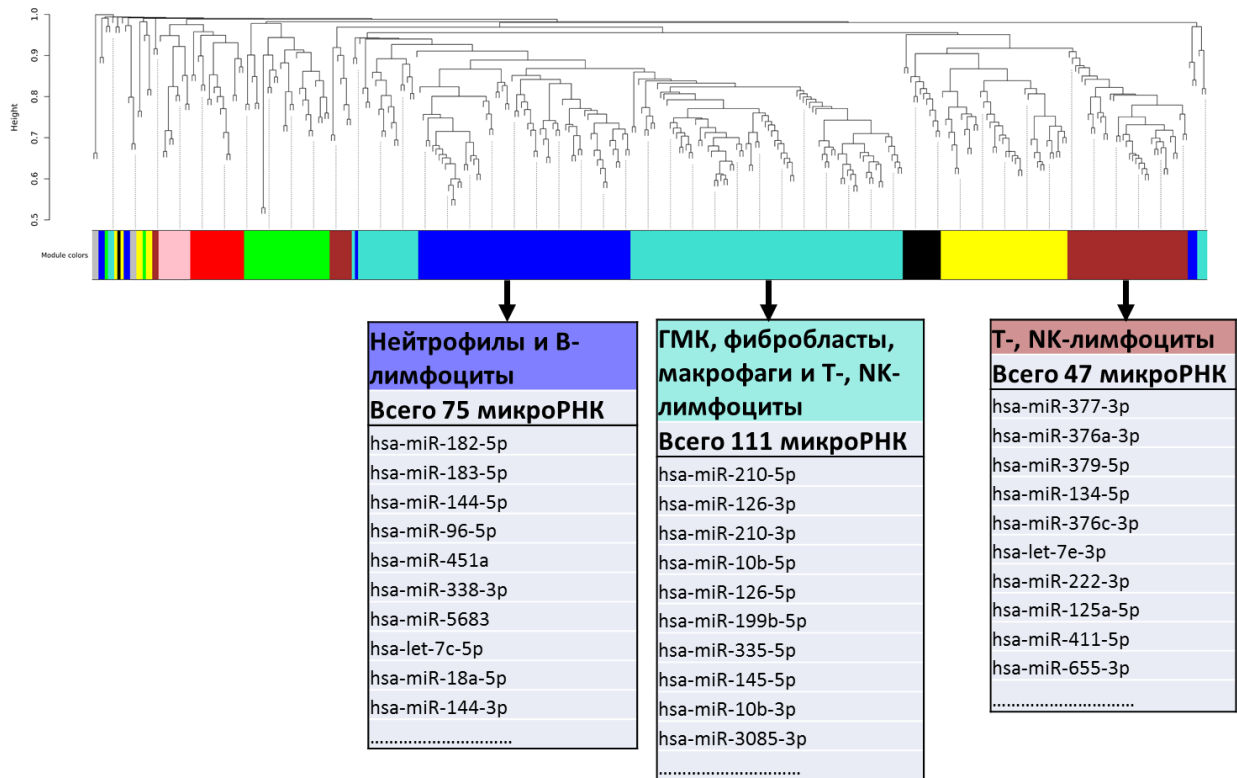
Полученный результат согласуется с данными литературы о перераспределении иммунных клеток между слоями артерий при атеросклерозе, что является критическим фактором прогрессии патологического процесса и развития осложнений. Например, скопление В-клеток наблюдается в области лимфоидно-подобных структур адвентиции артерий на определенной стадии их атеросклеротического поражения [176; 177].

3.1.5 Анализ модулей коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий

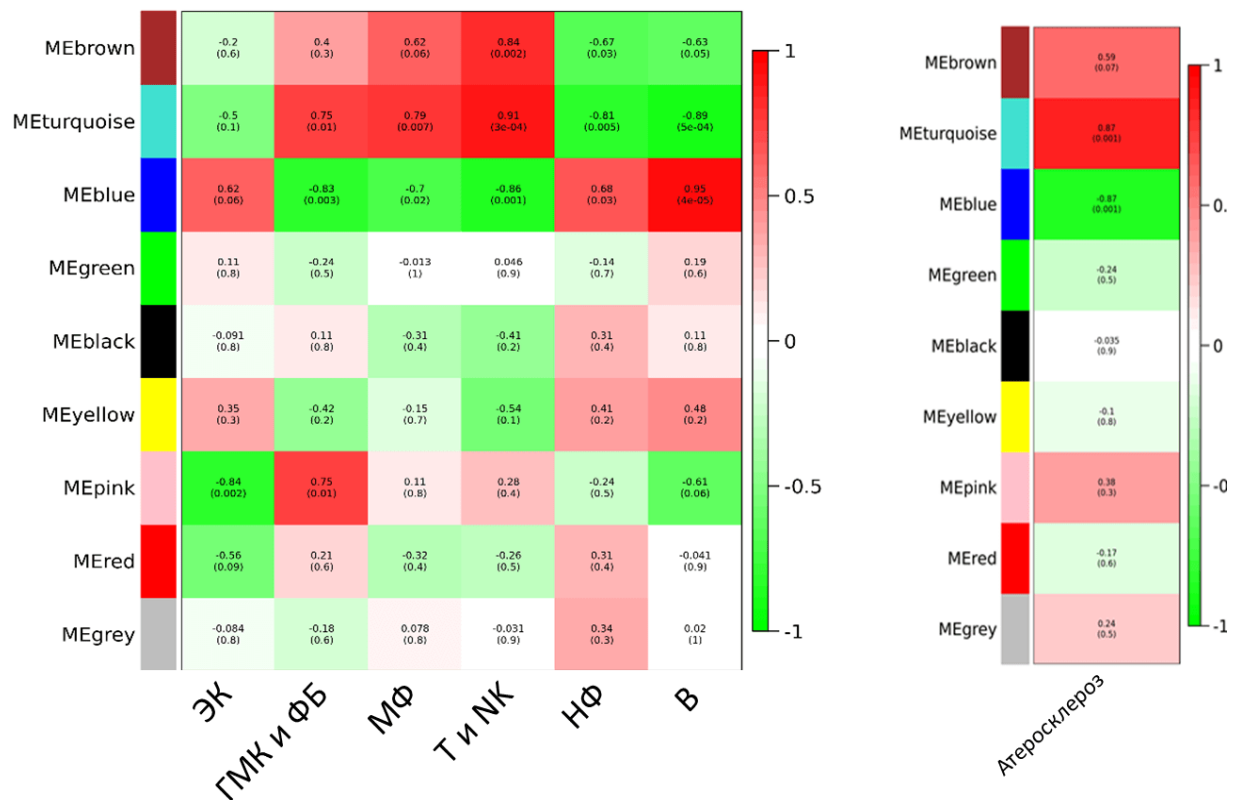
Различные микроРНК при развитии атеросклероза или изменении клеточного состава артерий могут изменять свою экспрессию совместно, формируя модули коэкспрессии. Для поиска модулей коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий использован анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов (англ. weighted gene coexpression network analysis, WGCNA). В результате 352 микроРНК, обнаруженных в сонных артериях, распределялось по 9 модулям (Рисунок 12а). Для каждого модуля была оценена корреляция Спирмена с долей различных клеточных типов, определенных с использованием алгоритма деконволюции клеточного состава сонных артерий (Рисунок 12б).

Четыре модуля показывали статистически значимую положительную корреляцию с прогнозируемой долей клеточных компонент. Бирюзовый модуль, который содержал наибольшее количество микроРНК (111), связан с Т- и НК-клетками, макрофагами, ГМК и фибробластами ($Rho = 0.91$; 0.79 ; 0.75 , соответственно). Синий модуль, включающий 75 микроРНК, коррелировал с В-клетками и нейтрофилами ($Rho = 0.95$; 0.68 , соответственно), а коричневый (47 микроРНК) – с Т- и НК-клетками ($Rho = 0.84$) и розовый (10 микроРНК) с ГМК и фибробластами ($Rho = 0.75$).

При функциональной аннотации микроРНК, входящих в четыре модуля, которые коррелируют с прогнозируемой долей клеточных компонент, выявлено, что микроРНК из синего модуля (В-клетки и нейтрофилы), связаны с наибольшим количеством категорий (Рисунок 13). Это были мерцательная аритмия (17 микроРНК) и легочный саркоидоз (8 микроРНК) из категории «Болезнь», регуляция циркадных ритмов (11 микроРНК) – «Функция», иммунная система (16 микроРНК) – «Тканевая специфичность», а также два транскрипционных фактора (STAT5 – 6 микроРНК, E2F1 – 15 микроРНК) и микроРНК из кластеров miR-941 (5 микроРНК) и miR-17 (7 микроРНК).



а



б

Рисунок 12 – Анализ модулей коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий с помощью метода WGCNA: а – общее число модулей; б - корреляция модулей с долей различных клеточных типов и атеросклеротическим поражением.

МикроРНК из бирюзового модуля (Т- и НК-клетки, макрофаги, ГМК и фибробласты), в свою очередь, показывали ассоциацию с инфекцией вируса Денге (9 микроРНК), поликистозом почек (10 микроРНК), онкологическими заболеваниями (11-13 микроРНК) и дифференцировкой нервных стволовых клеток (6 микроРНК).

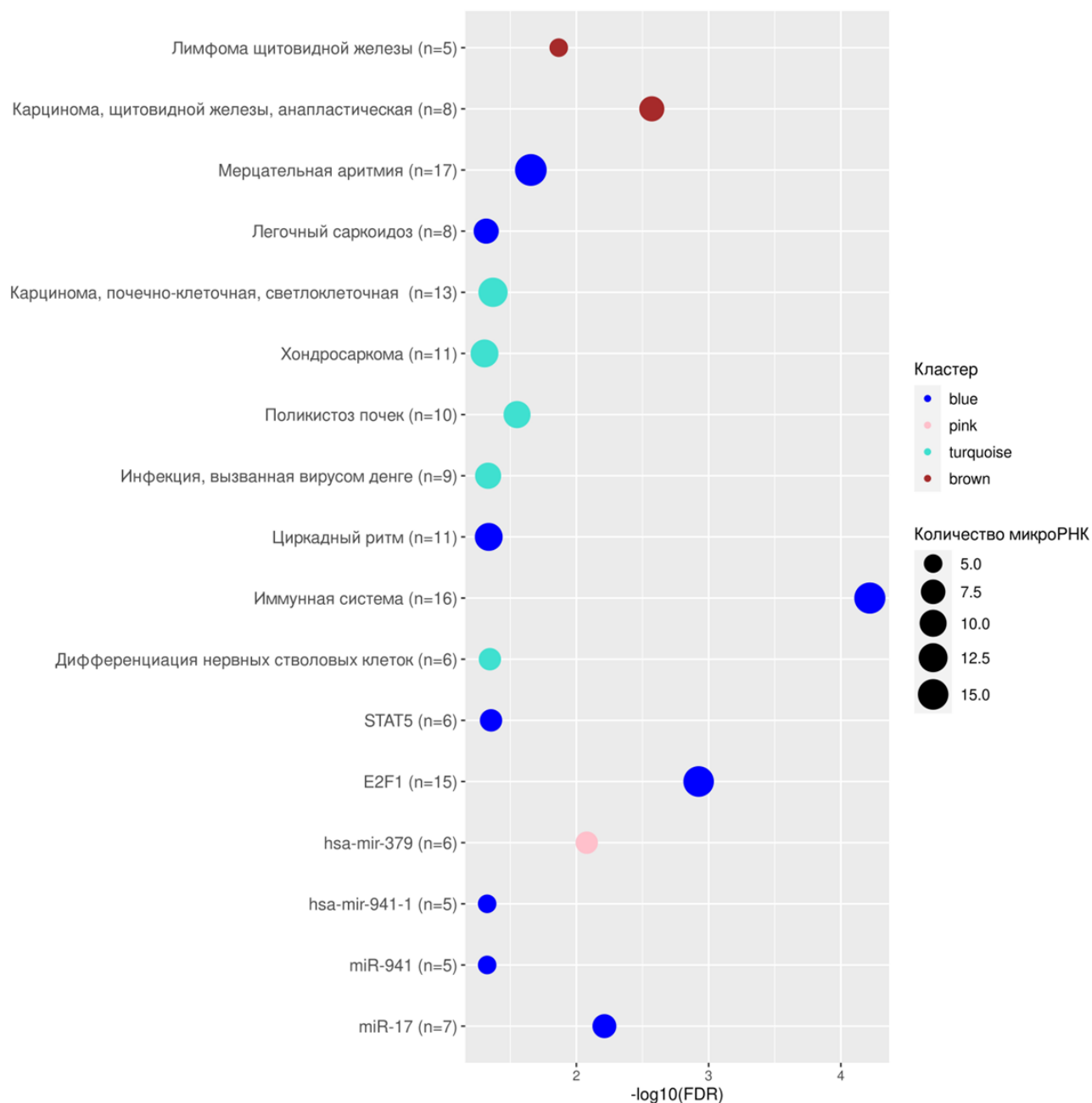


Рисунок 13 – Основные функциональные категории, которые характеризуют четыре модуля коэкспрессии микроРНК в клетках сонных артерий.

МикроРНК из коричневого модуля (Т- и НК-клетки) были ассоциированы с онкологическими заболеваниями – лимфома (5 микроРНК) и карцинома щитовидной железы (8 микроРНК). Розовый модуль (ГМК+ФБ) связан с микроРНК из кластера miR-379 (6 микроРНК).

Для трех модулей также показано значимое пересечение с дифференциально-экспрессируемыми микроРНК между атеросклеротической бляшкой и относительно интактной частью сонных артерий (Рисунок 12а). В бирюзовый модуль входило 65 микроРНК с различиями в уровне экспрессии между сравниваемыми тканями, в синий – 46 микроРНК, а в коричневый – 13 микроРНК.

3.2 Оценка профиля метилирования ДНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий

Для оценки профиля метилирования ДНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий использованы образцы, полученные от 16 пациентов с клинически выраженным атеросклерозом (Рисунок 14), из них мужчин было 10 (63%) человек.

Возраст пациентов составил 51–74 лет. Степень стеноза сонных артерий варьировала от 70 до 99%. В анамнезе у 5 (31%) пациентов было ОНМК, из них только у двух было нарушение мозгового кровообращения в бассейне средней мозговой артерии, причем пациент DAE60 перенес 2 инсульта в анамнезе (за 6 лет и 4 месяца до операции). Гистологически атеросклеротические бляшки сонных артерий принадлежали к II-VI типам. Пациенту DAE57 операция каротидная эндартерэктомия проводилась повторно из-за рестеноза артерии, что подтверждено гистологически. У 3 (19%) пациентов отмечалось также атеросклеротическое поражение коронарных (ИМ в анамнезе) или периферических артерий. У каждого пациента из данной группы было не менее одного из традиционных факторов риска ССЗ (артериальная гипертензия+ожирение/курение). Сахарный диабет 2 типа отмечен у 4 пациентов. Все пациенты принимали лекарственные препараты из групп статинов, антигипертензивных препаратов и антикоагулянтов/дезагрегантов.

Оценка профиля метилирования ДНК проведена с использованием микрочипа Infinium MethylationEPIC (Illumina). После проведения фильтрации данных по качеству, доступными для анализа осталось 795729 CpG-сайтов, из которых 8181 CpG-сайтов приходится на регион – 3 кб в области генов микроРНК.

По уровню метилирования ДНК атеросклеротические бляшки сонных артерий разделялись на две группы (Рисунок 14, 15). Такое распределение образцов наблюдалось, как по уровню метилирования всех анализируемых CpG-сайтов, так и CpG-сайтов генов микроРНК. Однако объяснить полученную кластеризацию образцов связью с клинико-морфологическими параметрами пациентов не удалось.

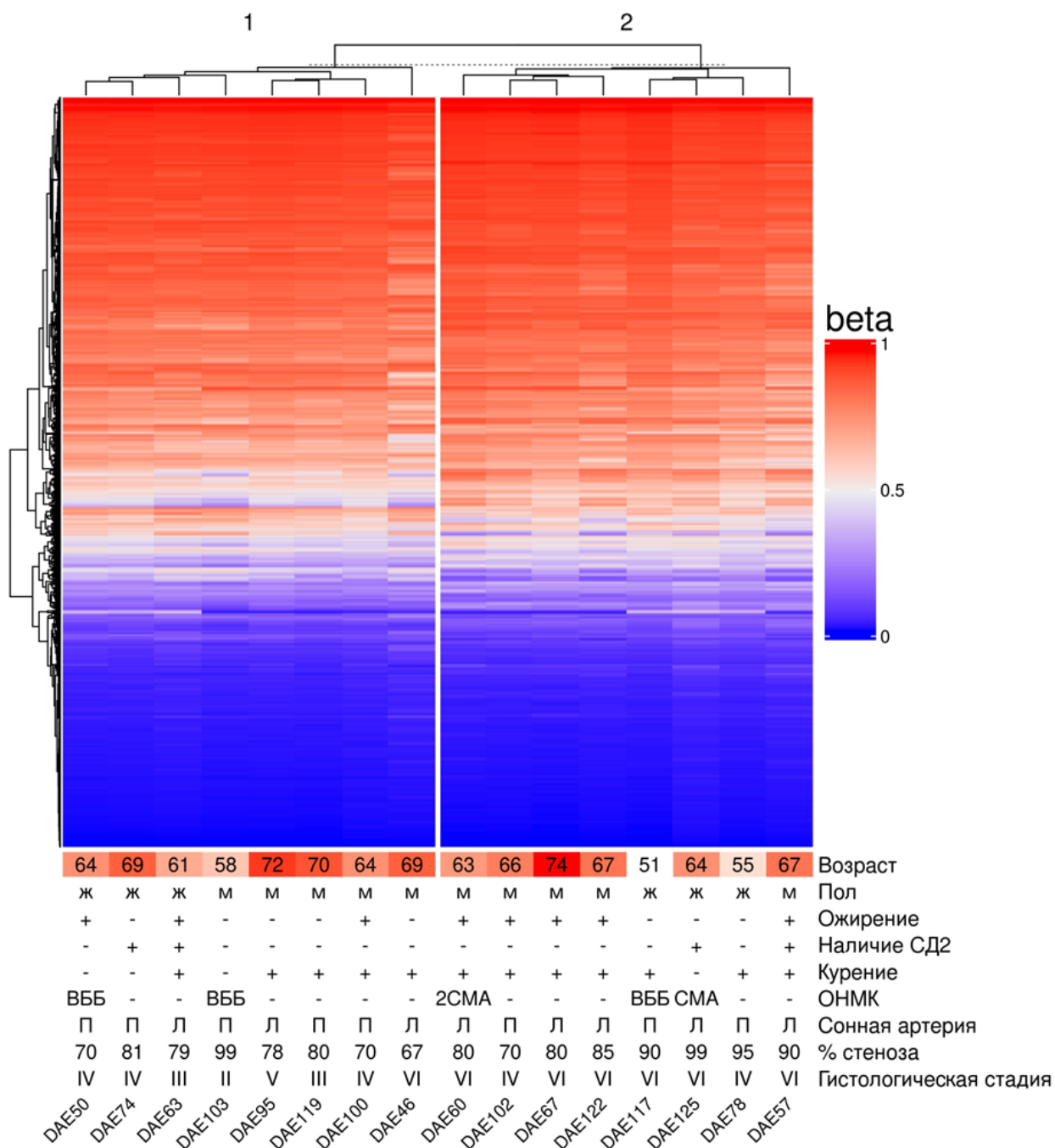


Рисунок 14 – Тепловая карта уровней метилирования ДНК в образцах сонных артерий (верхний); клиническая характеристика пациентов (нижний). Примечание: м – мужчина, ж – женщина, СД2 – сахарный диабет 2 типа, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ВББ - вертебробазилярный бассейн, СМА – средняя мозговая артерия, Л – левая сонная артерия, П – правая сонная артерия, РС – рестеноз.

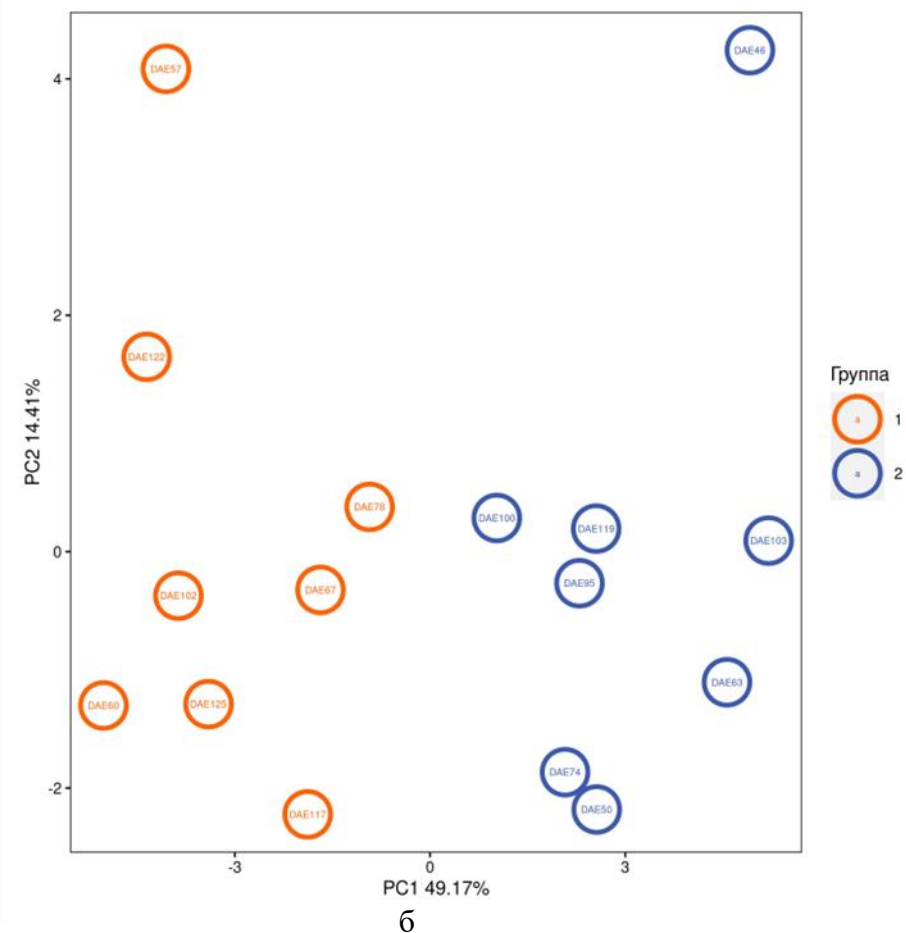
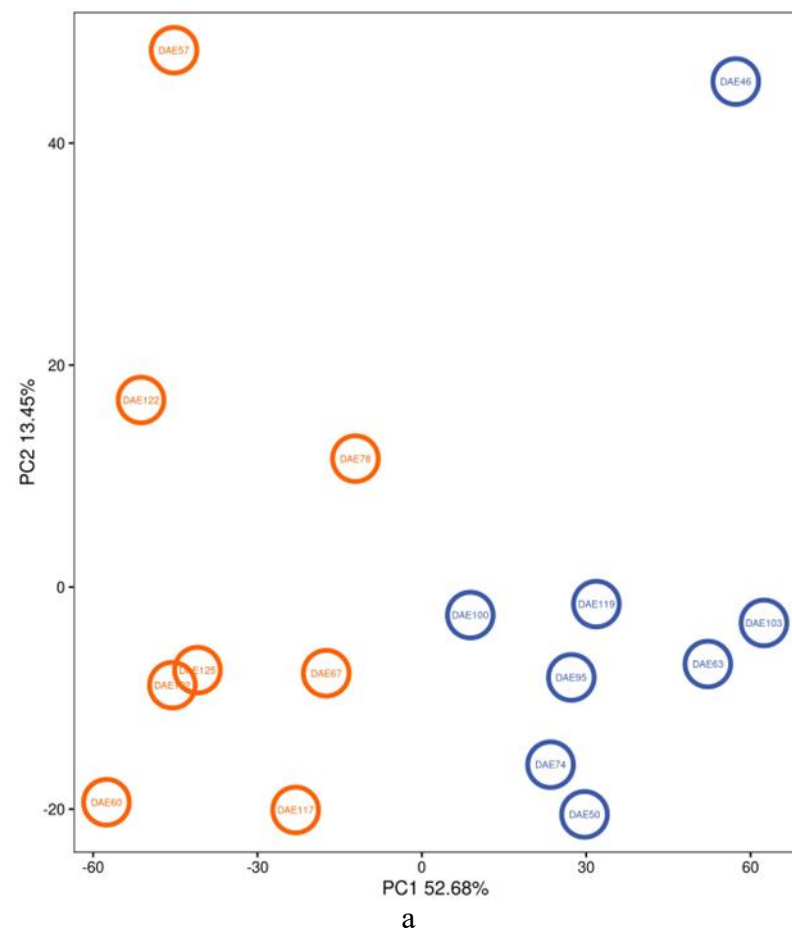


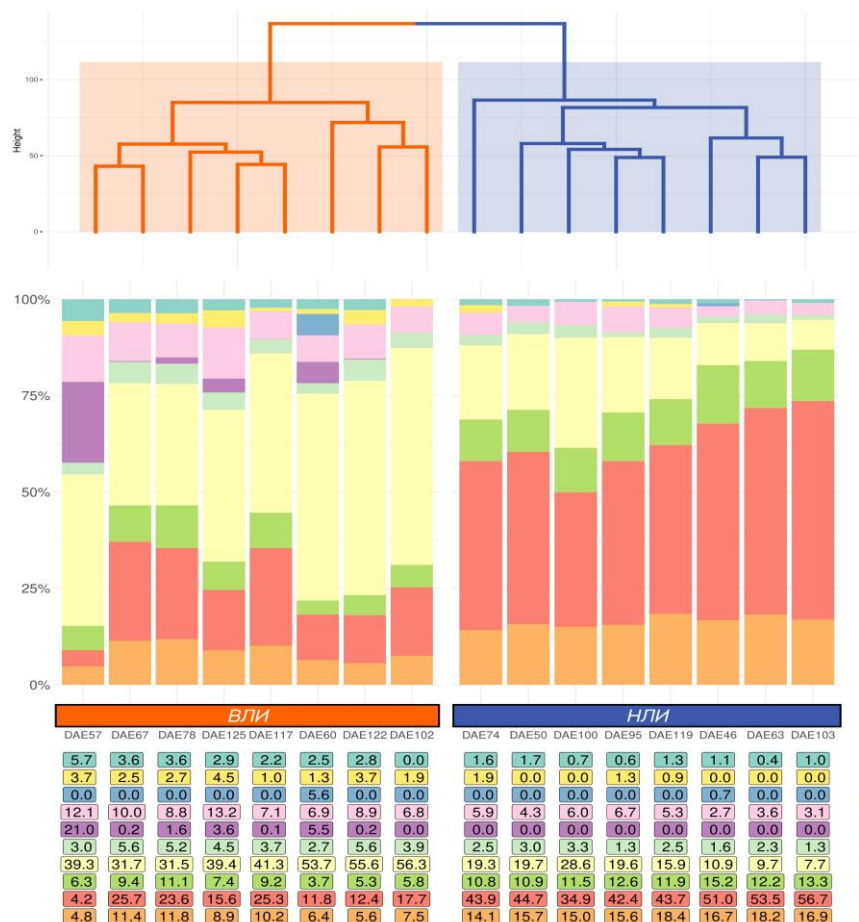
Рисунок 15 – Диаграмма расположения исследованных образцов в пространстве первых двух компонент, полученных на основании профилей метилирования по всем CpG-сайтам (а) и генов микроРНК (б) с помощью метода PCA (числа в кружках соответствуют идентификационному номеру пациента).

Используя данные об уровне метилирования ДНК, мы рассчитали клеточный состав атеросклеротических бляшек сонных артерий с использованием биоинформатического алгоритма EpiDISH [171]. В стандартном рефересном наборе, данный алгоритм позволяет определить в образце долю 10 различных типов клеток (эпителий, фибробласты, жировые клетки, В-, Т- (CD8-, CD4-), NK-клетки, моноциты, нейтрофилы и эозинофилы).

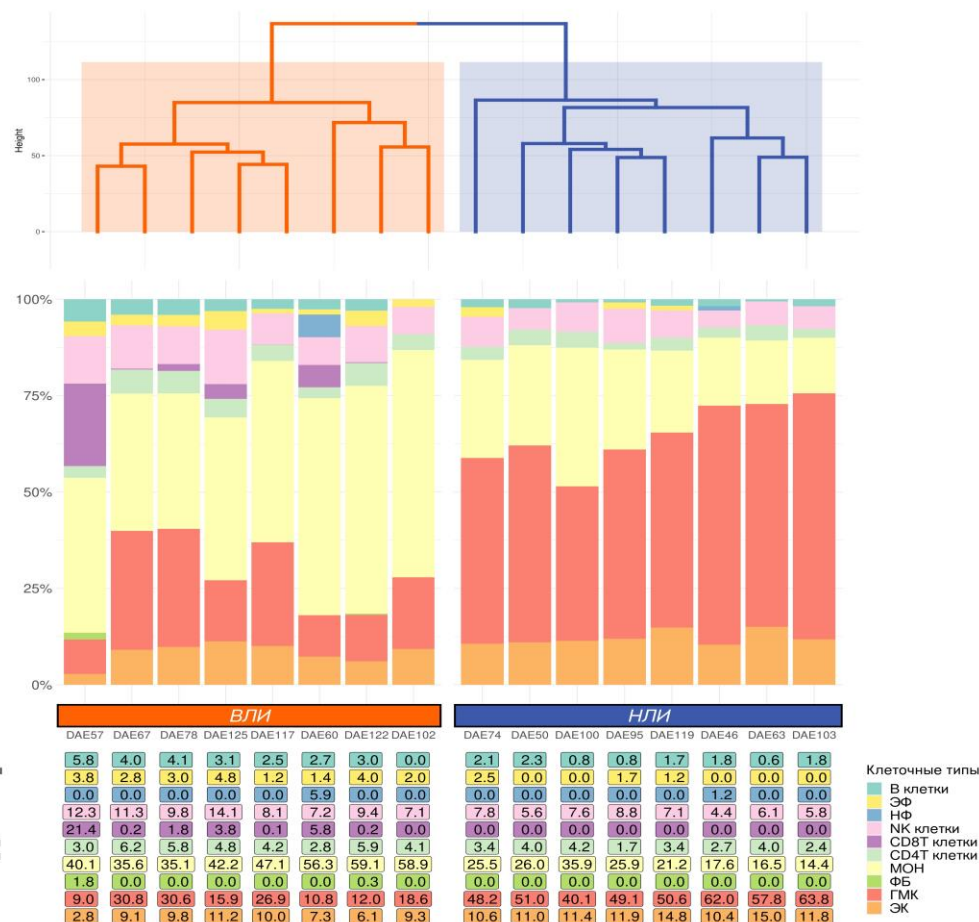
В результате использования алгоритма EpiDISH, расчетная доля иммунных клеток в атеросклеротических бляшках сонных артерий варьировала от 24% до 86% и полностью объясняла их разделение на группы (Рисунок 16а). Поскольку стандартная рефересная панель алгоритма предложена для опухолевых тканей, нами был разработан референс, адаптированный для стенки артерии. Он включал набор CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для эндотелиальных клеток (GSE84395), фибробластов (GSE40699), ГМК (GSE40699) и иммунных клеток лейкоцитарного ряда (GSE35069). Использование референсного набора CpG-сайтов, адаптированного для стенки артерии, показало схожие результаты, о связи кластеризации образцов с долей иммунных клеток [178–183].

Следует отметить, что образец DAE57 сильно отличается по своему клеточному составу от других образцов: большей долей иммунных клеток (особенно CD8-Т-клеток), меньшей – ГМК и эндотелиальных клеток, а также наличием фибробластов (Рисунок 16б). Это может объясняться рестенозом данной артерии. У пациента DAE60, который перенес 2 инсульта в бассейне средней мозговой артерии в анамнезе (за 6 лет и 4 месяца до операции), в атеросклеротических бляшках сонных артерий регистрировалась большая доля нейтрофилов.

При сравнении двух групп атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой (ВЛИ) и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (НЛИ) по уровню метилирования 795729 CpG-сайтов, обнаружено 42643 дифференциально-метилованных CpG-сайтов ($\Delta\text{-Beta} > 0.20$ и $\text{FDR} < 0.05$), из них 275 CpG-сайтов приходилось на регион – 3 кб в области генов микроРНК, а 10 CpG-сайтов непосредственно располагались в генах микроРНК (Таблица 11). Из них 7 CpG-сайтов характеризовались увеличением уровня метилирования в группе ВЛИ по сравнению с НЛИ, а три CpG-сайта, наоборот, снижением уровня метилирования.



а



б

Рисунок 16 – Кластеризация (верхний) и относительные доли клеток (средний и нижний) на основании профилей метилирования ДНК в образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий с использованием биоинформатического алгоритма EpiDISH и стандартного референса CpG-сайтов (а) и референса CpG-сайтов, адаптированного для стенки артерии (б). Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, НФ - нейтрофилы, ГМК - гладкомышечные клетки, ФБ - фибробласты, ЭК - эндотелиальные клетки, ЭФ - эозинофилы, МОН - моноциты.

Таблица 11 – Дифференциально-метилованные CpG-сайты, расположенные в генах микроРНК, выявленные между группами атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой (ВЛИ) и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (НЛИ)

CpG-сайт	микроРНК	Δ -Beta (ВЛИ- НЛИ)	FDR
cg25214966	miR-199a-2	0.334	3.23E-05
cg02875879	miR-302a; miR-302a-5p	0.221	3.24E-05
cg01942816	miR-589	0.240	1.62E-05
cg10259889	miR-4285	0.246	6.38E-05
cg07018107	miR-1208	-0.209	0.000913
cg09951047	miR-3074; miR-24-1; miR-3074-3p	0.293	0.000113
cg10432569	miR-196a-1; miR-196a-1-3p	0.219	0.001207
cg11375638	miR-4524b; miR-4524a	-0.264	0.000164
cg22576612	miR-4319	0.262	9.87E-05
cg01966791	miR-1914; miR-1914-5p	-0.320	6.81E-05

Учитывая небольшое количество собственных образцов, дополнительно к анализу были привлечены внешние данные, а именно, уровни метилирования CpG-сайтов в атеросклеротических бляшках сонных артерий, полученные от пациентов с/без ОНМК в анамнезе (n=38, Infinium HumanMethylation450 BeadChip, GSE66500; [56]). Во внешних данных также наблюдалась схожая картина кластеризации – две крупные группы, расчетная доля иммунных клеток варьировала от 9% до 78%, что также полностью объясняет кластеризацию образцов сонных артерий (Рисунок 17).

По указанным обозначениям 408503 проб пересекались между Infinium HumanMethylation450 и Infinium MethylationEPIC. Из них 7764 CpG-сайтов были дифференциально-метилованы между атеросклеротическими бляшками сонных артерий с высокой (ВЛИ) и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (НЛИ; Δ -Beta>0.20 и FDR<0.05). Кроме того, 6553 (84%) CpG-сайтов также были дифференциально-метилованы при анализе нашей выборки.

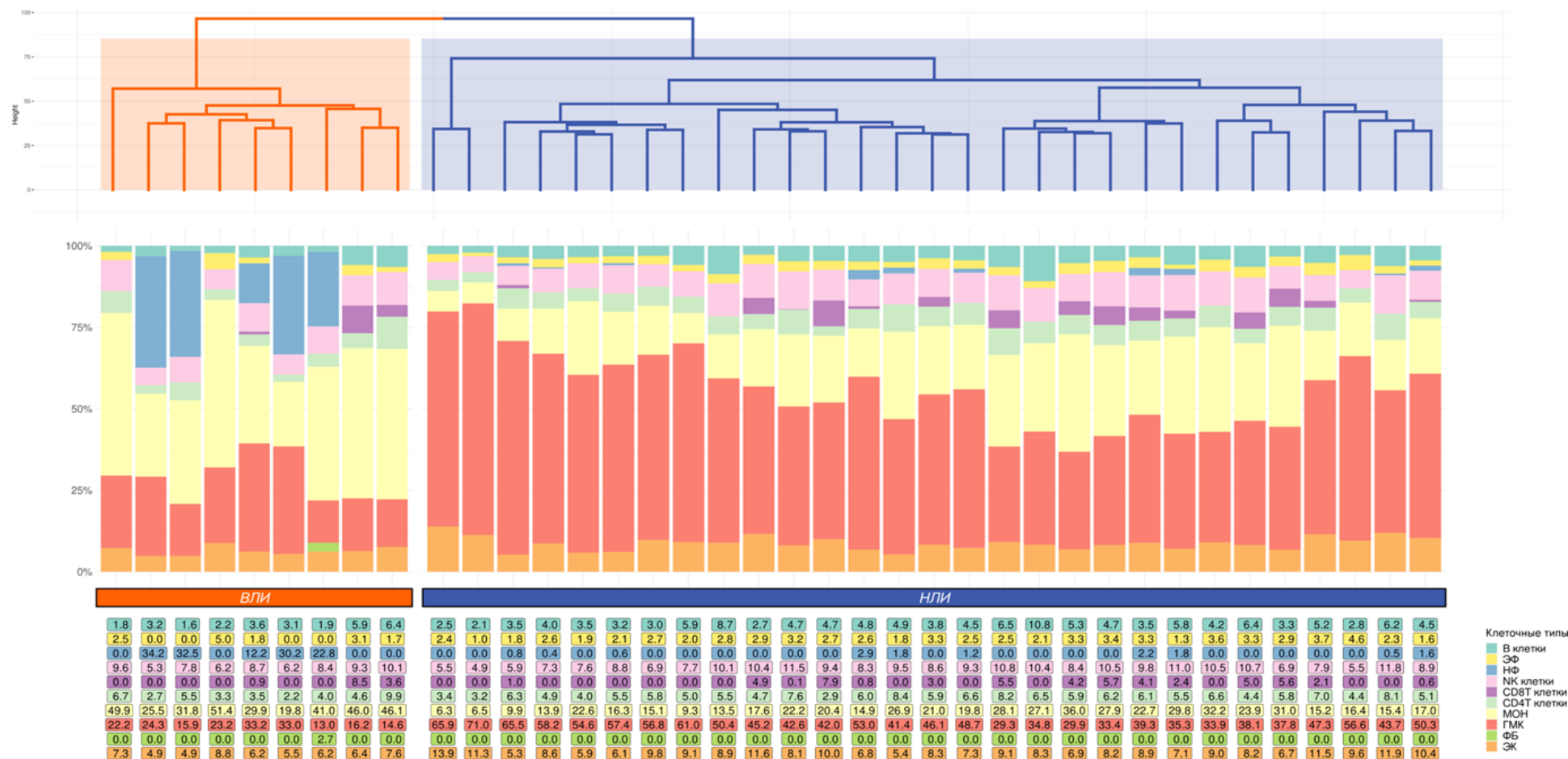


Рисунок 17 – Кластеризация (верхний) и относительные доли клеток (средний и нижний) на основании профиля метилирования ДНК в образцах атеросклеротических бляшек сонных артерий, полученные от пациентов с/без ОНМК в анамнезе (n=38, Infinium HumanMethylation450 BeadChip, GSE66500) и рефереса CpG-сайтов, адаптированного для стенки артерии. Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, НФ - нейтрофилы, ГМК - гладкомышечные клетки, ФБ - фибробласты, ЭК - эндотелиальные клетки, ЭФ - эозинофилы, МОН - моноциты.

Данное обогащение является статистически значимым (точный тест Фишера $p\text{-value} < 2.2\text{e-}16$), из них 70 CpG-сайтов приходились на регион – 3 кб в области генов микроРНК, а 4 – непосредственно пересекались с генами микроРНК и демонстрировали изменение уровня метилирования, совпадающее с ранее обнаруженным в нашей выборке (Таблица 12). Это свидетельствует о том, что установленные зависимости носят общий характер, а не вызваны ошибками измерения или неоднородностью формирования выборки.

Таблица 12 – Дифференциально-метилованные CpG-сайты, расположенные в генах микроРНК, выявленные между группами атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой (ВЛИ) и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (НЛИ)

CpG-сайт	микроРНК	$\Delta\text{-Beta}$ (ВЛИ- НЛИ)	FDR
cg10432569	miR-196a-1; miR-196a-1-3p	0.238	6.09E-07
cg09951047	miR-3074; miR-24-1; miR-3074-3p	0.208	4.19E-06
cg25214966	miR-199a-2	0.210	4.47E-06
cg01966791	miR-1914; miR-1914-5p	-0.226	8.11E-08

Таким образом, паттерн метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий ассоциирован с их клеточным составом. Приблизительный клеточный состав образца артерии человека может быть получен на основе данных о метилировании ДНК в нем. Молекулярная классификация атеросклеротических бляшек имеет важное значение, а развитие подходов биоинформатического «разложения» образцов позволяет учитывать их клеточную гетерогенность и, в перспективе, находить изменения на уровне отдельных типов клеток.

3.3 Оценка экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий

По причине высокой вариабельности экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и для установления связи экспрессии микроРНК с метилированием ДНК проведено исследование 14 образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий. Это были те же пациенты, у которых проведен анализ уровня метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в предыдущем разделе, за исключением двух образцов (DAE100, DAE125), которые не прошли фильтрацию по качеству. Подробная клиническая характеристика пациентов, от которых получены биоптаты, приведена в предыдущем разделе и на Рисунке 18.

На один образец в среднем приходилось 3.3 – 2.1 миллиона прочтений. На области генома, в которых расположены известные микроРНК, было выравнено от 165.5 тысяч до 7.7 миллионов прочтений, в зависимости от образца. В дальнейший анализ вошли микроРНК, для которых уровень экспрессии был более 10 CPM (количество прочтений на миллион) хотя бы в одном образце. Всего в образцах артерий было обнаружено 379 микроРНК. Из них 322 микроРНК также обнаруживались в парных образцах пораженной атеросклерозом и относительно интактной части сонных артерий. МикроРНК, не вошедшие в общую группу, имели низкий уровень экспрессии в атеросклеротических бляшках (в среднем 8.65 – 5.1 CPM).

Кластерный анализ не показал четкого распределения образцов на отдельные группы (Рисунок 18). Однако отмечается, что профиль экспрессии образца DAE57 сильно отличается от других образцов, что, по-видимому, связано с рестенозом артерии у этого пациента. Анализ главных компонент и оценка вклада различных клеточных компонент в уровень экспрессии микроРНК показали разделение образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий на две группы – с ВЛИ и НЛИ, схожим образом с метилированием ДНК (Рисунок 19). Первая группа – ВЛИ, содержала образцы с высокой долей макрофагов >5% или общего лейкоцитарного компонента >58%. Во второй группе макрофаги практически отсутствовали <1%, а доля ГМК и фибробластов была >50%.

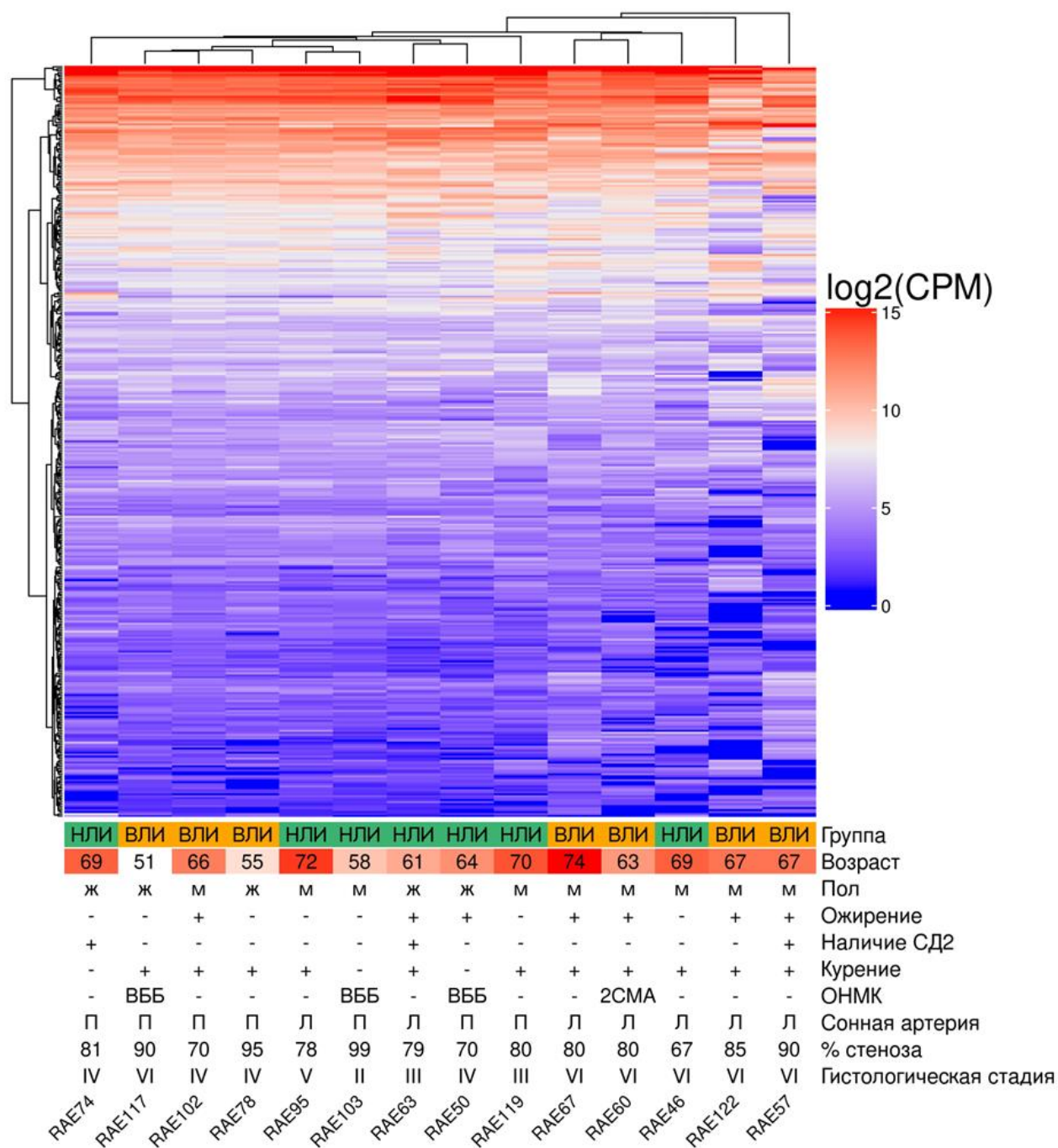
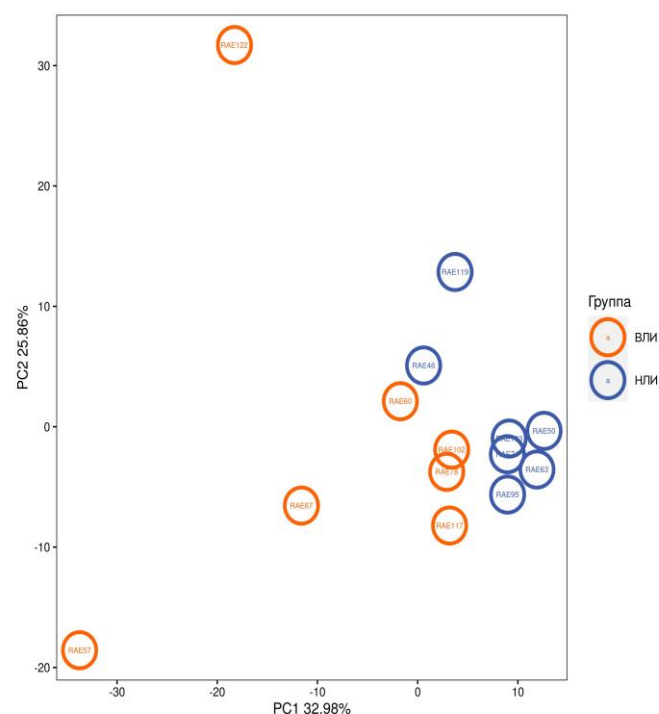


Рисунок 18 – Тепловая карта уровней экспрессии микроРНК в образцах сонных артерий (вверху); клиническая характеристика пациентов (внизу). Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, м – мужчина, ж – женщина, СД2 – сахарный диабет 2 типа, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, ВББ – вертебробазилярный бассейн, СМА – средняя мозговая артерия, Л – левая сонная артерия, П – правая сонная артерия.



а



б

Рисунок 19 – а) Диаграмма расположения исследованных образцов в пространстве первых двух компонент, полученных на основании уровней экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артериях с помощью метода главных координат (РСА)

б) Относительные доли клеток на основании профилей экспрессии микроРНК в образцах атеросклеротических бляшек. Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, НФ - нейтрофилы, МФ - макрофаги, ГМК и ФБ - гладкомышечные клетки и фибробласты, ЭК -эндотелиальные клетки.

Анализ дифференциальной экспрессии микроРНК между группами атеросклеротических бляшек с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией, позволил выделить 51 микроРНК (Приложение В), различающихся по уровню экспрессии ($|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$), из них 20 (39%) микроРНК имели сниженную экспрессию в пораженной атеросклерозом сонной артерии с ВЛИ по сравнению с НЛИ, а 31 (61%) - повышенную (Рисунок 20).

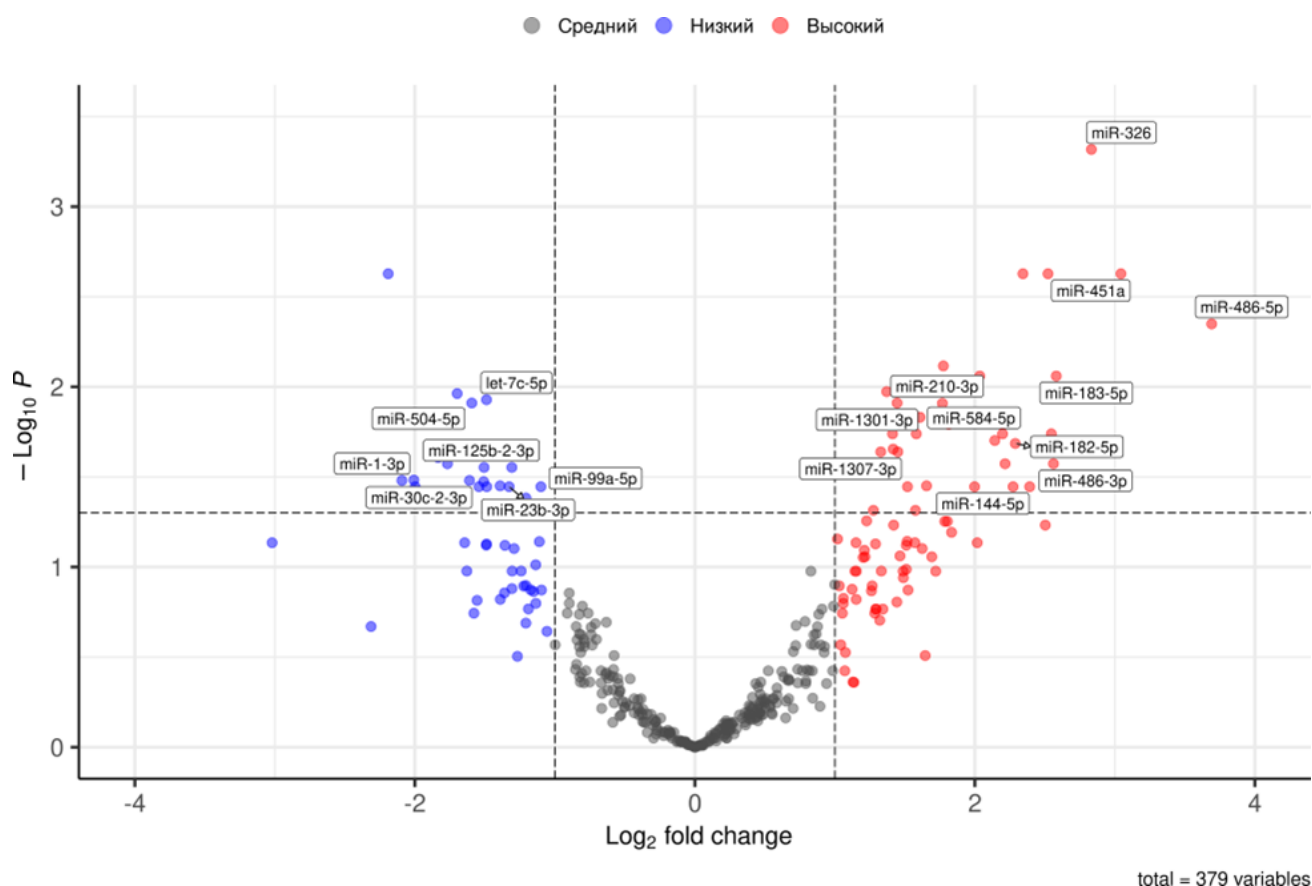


Рисунок 20 – Диаграмма рассеяния разности экспрессии микроРНК между образцами атеросклеротических бляшек с высокой (ВЛИ) и низкой (НЛИ) лейкоцитарной инфильтрацией. Примечание: Точки отображают анализируемые микроРНК, пунктирные линии – принятые пороговые значения для уровня значимости ($FDR=0.05$) и показателя разности экспрессии микроРНК ($|\log_2FC|=1$).

При этом 18 микроРНК были также дифференциально-экспрессированы между пораженными атеросклерозом и относительно интактными сонными артериями, из них для 7 микроРНК совпадало направление изменения экспрессии (Таблица 13).

Таблица 13 – Спектр дифференциально-экспрессированных микроРНК между относительно интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией

микроРНК	Уровень экспрессии (CPM) M(Q25, Q75)				Кратность различий (log2FC)	
	ИСА	БСА	НЛИ	ВЛИ	БСА- ИСА	ВЛИ- НЛИ
miR-144-5p	763 (696,1274)	48 (29,152)	5 (3,10)	22 (9,71)	-3.93	2.273
miR-451a	99103 (36169,115930)	5626 (3152,5862)	2138 (1077,4001)	8288 (7813,24509)	-3.893	3.043
miR-182-5p	362 (324,778)	41 (26,50)	34 (18,48)	38 (30,184)	-3.827	2.289
miR-183-5p	129 (116,311)	17 (15,21)	15 (13,18)	27 (21,88)	-3.547	2.581
miR-486-5p	3610 (1960,4174)	697 (369,947)	891 (356,1549)	2757 (1292,9751)	-2.677	3.691
miR-486-3p	10 (7,15)	3 (2,3)	4 (2,6)	7 (5,30)	-2.657	2.561
miR-584-5p	24 (17,26)	4 (3,5)	8 (5,11)	13 (10,50)	-2.529	2.198
miR-99a-5p	27233 (15062,32096)	3501 (3027,5530)	2740 (2644,4055)	1472 (1344,1631)	-2.459	-1.1
let-7c-5p	3542 (2146,4885)	627 (509,666)	593 (579,973)	329 (218,342)	-2.348	-1.488
miR-125b-2-3p	144 (73,151)	34 (22,35)	81 (61,93)	28 (24,37)	-1.963	-1.308
miR-1-3p	1014 (803,1484)	2088 (1654,3197)	7587 (3784,9068)	1648 (419,2428)	1.005	-2.093
miR-30c-2-3p	27 (25,35)	55 (54,64)	59 (48,84)	33 (11,37)	1.014	-1.543
miR-1301-3p	23 (16,24)	44 (41,47)	17 (16,19)	44 (42,52)	1.117	1.444
miR-326	21 (15,23)	42 (39,47)	10 (8,13)	50 (42,56)	1.171	2.832
miR-23b-3p	4536 (4034,4814)	8947 (7474,15934)	4044 (3672,5737)	2263 (1302,2658)	1.227	-1.327
miR-1307-3p	62 (48,69)	166 (161,186)	98 (82,118)	224 (196,257)	1.556	1.328
miR-504-5p	50 (45,50)	174 (136,221)	70 (46,81)	24 (14,28)	1.643	-1.594
miR-210-3p	105 (84,172)	934 (837,1029)	153 (125,276)	484 (403,761)	2.688	1.768

Примечание: БСА - атеросклеротические бляшки сонных артерий, ИБС - относительно интактная часть сонных артерий, ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией

Наиболее значимые различия по уровню экспрессии и вариабельности микроРНК между группами атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией обнаружены для miR-326 ($\log_2FC = 2.83$ и $FDR < 0.05$). При этом экспрессия данной микроРНК была выше в пораженных атеросклерозом сонных артериях по сравнению с их интактными частями ($\log_2FC = 1.17$ и $FDR < 0.05$).

Согласно литературным данным, miR-326 участвует в Т-клеточном ответе и регулирует синтез IL-17 в лейкоцитах при аутоиммунных заболеваниях (рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, системная красная волчанка) [184–186]. Участие IL-17 в сердечно-сосудистых заболеваниях зависит от контекста, типа клеток, продуцирующих его, и цитокинового профиля местного микроокружения. Повышенная продукция IL-17, связанная с увеличением IL-10 (регуляторный Th17) и снижением IFN γ , скорее всего, будет ограничивать развитие патологического процесса и способствовать стабильности бляшек. Напротив, совместная продукция IL-17 и IFN γ , приводит к прогрессированию поражения и нестабильности [187]. miR-326 стимулирует дифференцировку Th17-клеток, посредством взаимодействия с фактором транскрипции Ets-1. Таким образом, увеличение экспрессии miR-326 может быть связано с патогенезом аутоиммунных заболеваний через стимуляцию дифференцировки Th17-клеток. Однако механизм связи экспрессии miR-326 с атеросклерозом неизвестен.

Особый интерес могут представлять микроРНК, для которых направление изменения экспрессии между пораженными атеросклерозом и относительно интактными частями сонных артерий противоположно изменению экспрессии в атеросклеротических бляшках с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией, так как эти изменения, скорее всего, ассоциированы с развитием атеросклероза и не объясняются изменением клеточного состава. Так, для уровня экспрессии двух микроРНК miR-451a и miR-486-5p была показана ассоциация с риском разрыва атеросклеротической бляшки коронарных артерий, причём их уровень также значительно снижался в плазме крови [188].

Таким образом, экспрессия микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий ассоциирована с их клеточным составом. Идентифицировано 18 дифференциально-экспрессированных микроРНК между относительно интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией ($|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$) [189–191].

3.4 Связь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий

3.4.1 микроРНК – регуляторы метилирования ДНК

Согласно данным литературы, микроРНК способны изменять уровень метилирования ДНК, регулируя ДНК-метилтрансферазы или метил-СрG-связывающие белки [35]. Например, под влиянием окисленных липопротеинов низкой плотности в культуре гладкомышечных клеток аорты человека происходит увеличение экспрессии *miR-29b*, мишенью которой является *DNMT3b*, что приводит к снижению экспрессии данного фермента, а также снижению метилирования в области промоторов генов *MMP2/MMP9*, которые в свою очередь вовлечены в миграцию клеток [192].

В нашем исследовании в клетках сонных артерий выявлены 13 микроРНК, мишенями которых являются ДНК-метилтрансферазы (*DNMT1* – ДНК-метилтрансфераза 1 и *DNMT3A* – ДНК-метилтрансфераза 3A), а также *MECP2* – метил СрG-связывающий белок 2 (Таблица 14). Данные микроРНК показали дифференциальную экспрессию между пораженными атеросклерозом и относительно интактными сонными артериями, причем большинство микроРНК регулируют *DNMT1*.

Несколько микроРНК с разнонаправленным изменением экспрессии между пораженными атеросклерозом и интактными сонными артериями регулировали *DNMT1*, *DNMT3A* и *MECP2*. Однако можно выделить 4 микроРНК (*miR-143-3p*, *miR-148a-3p*, *miR-126-3p*, *miR-155-5p*), которые имели высокий уровень экспрессии в образцах сонных артерий. Так, *DNMT1* регулируется двумя высоко экспрессируемыми микроРНК (*miR-126-3p* и *miR-148a-3p*), показывающими согласованное уменьшение уровня экспрессии в атеросклеротических бляшках относительно интактных сонных артерий.

DNMT3A регулируется только одной мажорной микроРНК (*miR-143-3p*), которая увеличивает свой уровень экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий, а *MECP2* регулируется *miR-155-5p*, также увеличивающей свой уровень экспрессии в атеросклеротических бляшках. Поскольку микроРНК чаще всего подавляют экспрессию мРНК генов-мишеней, мы можем ожидать, что уровень *DNMT1* будет повышен, а *DNMT3A* и *MECP2* снижен в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Для проверки этой гипотезы мы обратились к данным об уровне экспрессии генов в образцах сонных артерий в сравнении с макроскопически интактными артериями ($n=64$, GSE43292). Анализ дифференциальной экспрессии мРНК между данными тканями был проведен с использованием инструмента GEO2R.

Таблица 14 – Спектр и уровень экспрессии микроРНК, которые регулируют ДНК-метилтрансферазы и метил-СрG-связывающий белок 2 в клетках сонных артерий

микроРНК	Мишень	Уровень экспрессии (CPM)		Кратность различий (log2FC)
		БСА	ИСА	
		M(Q25, Q75)	M(Q25, Q75)	
miR-342-3p	DNMT1	795 (771,822)	311 (311,338)	1.319
miR-17-5p	DNMT1	709 (609,733)	1143 (1093,1559)	-1.013
miR-20a-5p	DNMT1	1437 (871,1534)	2554 (2158,4336)	-1.195
miR-185-5p	DNMT1	551 (508,737)	1261 (880,1309)	-1.332
miR-19b-3p	DNMT1	394 (223,442)	909 (613,1257)	-1.334
miR-148a-3p	DNMT1	4630 (3198,9572)	15615 (12563,16011)	-1.451
miR-377-3p	DNMT1	3 (3,6)	9 (8,13)	-1.535
miR-18a-5p	DNMT1	17 (7,19)	53 (32,68)	-1.857
miR-126-3p	DNMT1	4495 (3316,6472)	44138 (42169,51175)	-3.018
miR-143-3p	DNMT3A	227530 (210975,348751)	98946 (77244,115813)	1.226
miR-194-5p	DNMT3A	97 (83,106)	316 (173,383)	-1.7
miR-155-5p	MECP2	960 (865,1312)	418 (344,449)	1.324
miR-19a-3p	MECP2, DNMT1	45 (27,85)	157 (115,227)	-1.609

Примечание: БСА - атеросклеротические бляшки сонных артерий, ИБС - относительно интактная часть сонных артерий.

В результате выявлено статистически значимое увеличение экспрессии гена *DNMT1* в атеросклеротических бляшках по сравнению с макроскопически интактными сонными артериями ($\log_2FC=0.37$ и $FDR<0.05$; Таблица 15). Экспрессия гена *MECP2*, наоборот, была ниже в атеросклеротических бляшках, чем в макроскопически интактных артериях ($\log_2FC=-0.16$ и $FDR<0.05$). Этот результат совпадает с ожидаемым исходя из изменения уровня экспрессии микроРНК в клетках сонных артерий.

Таблица 15 – Дифференциальная экспрессия генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *MECP2* в клетках сонных артерий по сравнению с интактными тканями (GSE43292)

Ген	Кратность различий (log2FC)	p-value	FDR
<i>DNMT1</i>	0.376	1.13e-06	0.00007
<i>MECP2</i>	-0.157	8.69e-03	0.04261
<i>DNMT3A</i>	0.035	4.31e-01	0.70250

3.4.2 Корреляция экспрессии микроРНК с метилированием ДНК

Известно, что инверсия метилирования ДНК в области промотора микроРНК приводит к изменению экспрессии микроРНК [34]. В частности, гипометилирование ДНК в предсказанном с помощью биоинформатики промоторе гена *miR-210*, индуцированное окисленными липопротеинами низкой плотности, приводит к увеличению экспрессии данной микроРНК в культуре гладкомышечных клеток аорты. У больных с атеросклерозом сонных артерий и инсультом, в свою очередь, в лейкоцитах наблюдается гипометилирование промотора гена *MIR210* по сравнению с контролем [193].

Из 29 идентифицированных в нашем исследовании дифференциально-метилированных CpG-сайтов между атеросклеротическими бляшками сонных артерий с различной степенью лейкоцитарной инфильтрации и приходившихся на регион ± 3 кб в области генов микроРНК, две микроРНК (*miR-199a-5p* и *miR-199a-3p*) были дифференциально-экспрессированы между относительно интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (Таблица 16).

Таблица 16 – МикроРНК, показавшие различие в уровнях экспрессии и метилировании ДНК между относительно интактными сонными артериями и атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией

микроРНК	Кратность различий (log2FC)		FDR		CpG-сайт	Δ Beta FDR	
	БСА-ИСА	ВЛИ-НЛИ	БСА-ИСА	ВЛИ-НЛИ		ВЛИ-НЛИ	
<i>miR-199a-3p</i>	-1.509	-0.853	0.0336	0.0031	cg24002149	0.321	6.17E-05
<i>miR-199a-5p</i>	-1.391	0.350	0.0354	0.21			

Примечание: БСА - атеросклеротические бляшки сонных артерий, ИБС - относительно интактная часть сонных артерий, ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией.

Оценка корреляции уровня их экспрессии с уровнем метилирования CpG-сайта cg24002149, расположенного на расстоянии 137 нуклеотидов от гена *MIR199A2*, показала статистически значимую отрицательную зависимость (*miR-199a-3p* [$Rho = -0.736$, $p\text{-value} = 0.00382$], *miR199a-5p* [$Rho = -0.666$, $p\text{-value} = 0.01148$], Рисунок 21). Это может указывать на регуляцию экспрессии данных микроРНК через метилирование в CpG-сайте cg24002149.

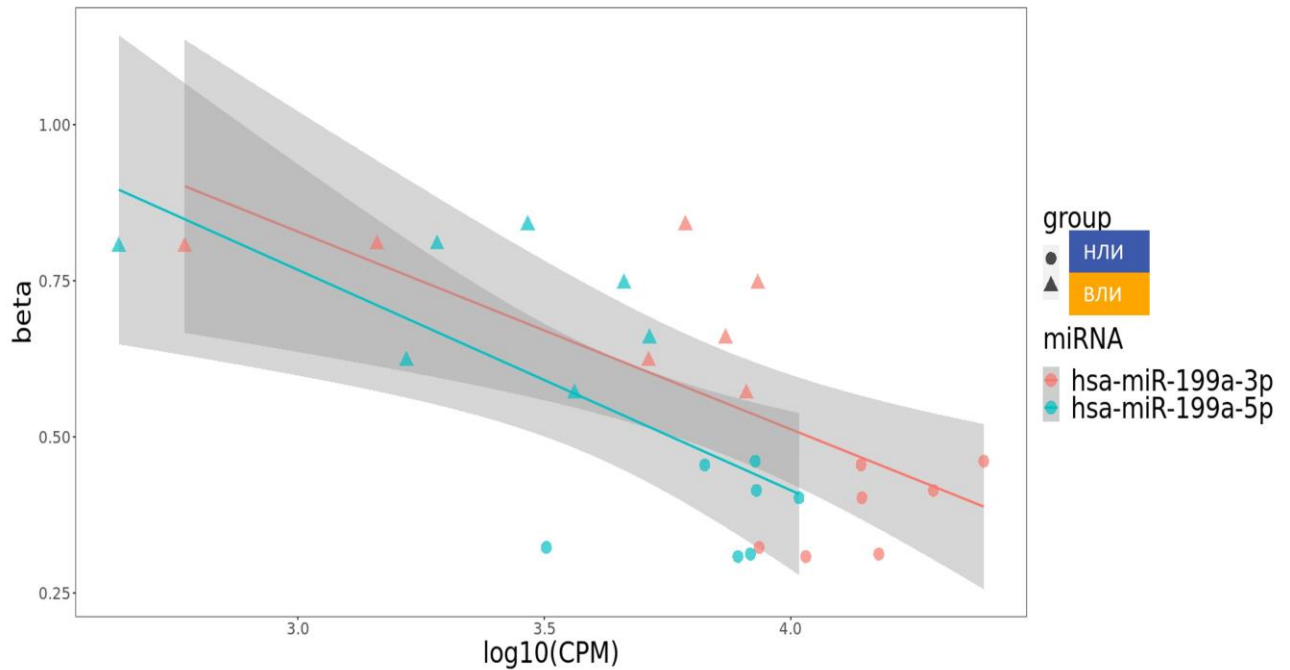


Рисунок 21 – Корреляция уровня экспрессии miR-199a-5p и miR-199a-3p с уровнем метилирования CpG-сайта cg24002149 в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией. Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, beta - уровень метилирования ДНК.

Для miR-199a-5p в клетках меланомы было показано ингибирующее воздействие на экспрессию аполипопротеинов класса E (ApoE). Помимо хорошо известной способности ApoE выводить богатые холестерином липопротеины из плазмы или усиливать высвобождение клеточных липидов из пенистых клеток, ApoE способен контролировать передачу сигналов в клетках иммунной системы и в сосудистой стенке. В частности, ApoE способен уменьшать воспаление в атеросклеротической бляшке, увеличивая уровень экспрессии miR-146a в моноцитах и макрофагах [194–196]. Данный факт согласуется с результатами настоящего исследования, поскольку в атеросклеротических бляшках сонных артерий с высокой долей лейкоцитарной инфильтрации уровень miR-199a-5p был ниже. Ещё одним возможным механизмом участия miR-199a-5p в развитии атеросклероза является координированное регулирование биодоступности NO посредством ингибирования экспрессии антиоксидантов и фосфорилирования eNOS [197].

В отношении miR-199a-3p выявлено, что снижение ее экспрессии в сыворотке наблюдается при остром инфаркте миокарда [198]. По-видимому, данную микроРНК можно использовать в качестве биомаркера риска развития острых сосудистых событий, поскольку для неё нами была обнаружена статистически значимая дифференциальная экспрессия между атеросклеротической бляшкой и относительно интактной частью артерии, хотя сила эффекта была небольшой ($|\log_2FC| < 1$), она совпадала по направлению с изменением в атеросклеротических бляшках при увеличении степени лейкоцитарной инфильтрации.

Наиболее значимые различия по уровню экспрессии и вариабельности микроРНК между группами атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией были обнаружены для miR-326. Мы провели анализ возможной регуляции экспрессии данной микроРНК через метилирование CpG-сайтов в области ее гена.

Уровень метилирования двух CpG-сайтов, расположенных вблизи гена данной микроРНК, показал статистически значимую корреляцию с ее уровнем экспрессии (cg08960830, [Rho = -0.78, p-value = 0.002]; cg25899829 [Rho = -0.76, p-value = 0.002]; Рисунок 22).

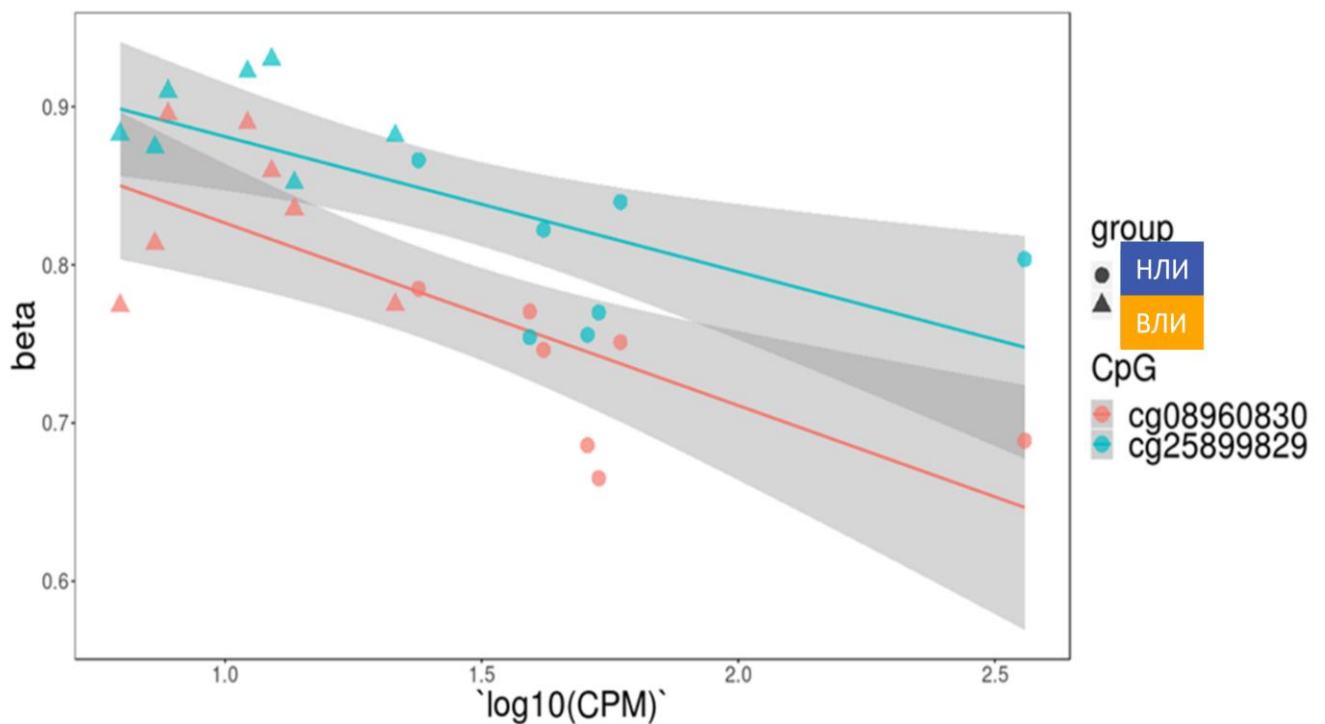


Рисунок 22 – Корреляция уровня экспрессии miR-326 с уровнем метилирования CpG-сайтов cg08960830 и cg25899829 в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией. Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, β - уровень метилирования ДНК.

Оба CpG-сайта, также, как и ген микроРНК, локализируются в первом интроне гена *ARRB1*. Один из CpG-сайтов (cg08960830) находится на расстоянии около 1 кб от TSS *MIR326*, что может свидетельствовать о потенциальном вхождении данного сайта в состав промоторной области. Другой CpG-сайт (cg25899829) локализуется в области нуклеотидной последовательности гена *MIR326*, что может свидетельствовать либо о совместном метилировании данного сайта с cg08960830, либо о более глубоких механизмах регуляции.

Согласно базе данных FANTOM5 [34], miR-326 имеет максимальный уровень экспрессии в клетках моноцитарного ростка, в частности в макрофагах, а гладкомышечные клетки «обеднены» данной микроРНК, что в значительной степени согласуется с представлением о клеточной специфичности данной микроРНК, полученной в нашем исследовании.

Таким образом, в атеросклеротических бляшках сонных артерий miR-126-3p, miR-148a-3p и miR-155-5p являются высоко экспрессирующимися и потенциально могут регулировать уровень DNMT1 и MECP2. В клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией уровень метилирования CpG-сайта cg24002149 отрицательно коррелирует с экспрессией miR-199a-5p и miR-199a-3p, а cg08960830 и cg25899829 – с экспрессией miR-326, что может свидетельствовать о тесной связи уровня метилирования в данных CpG-сайтах с уровнем экспрессии микроРНК.

3.5 Идентификация полиморфизма в структуре зрелой микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом

3.5.1 Сопоставление результатов экзомного секвенирования с секвенированием микроРНК

В данном разделе работы использовалась выборка из 8 пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. Это были те же пациенты, у которых проведен анализ уровня экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в предыдущих разделах (DAE57, DAE60, DAE122, DAE67, DAE102, DAE46, DAE100, DAE95).

Все пациенты были мужчинами. Степень стеноза сонных артерий варьировала от 67 до 90%. В анамнезе у одного пациента было ОНМК (DAE60). У каждого пациента из данной группы было не менее одного из традиционных факторов риска ССЗ (артериальная гипертензия+ожирение/курение). Сахарный диабет 2 типа отмечен также только у одного пациента (DAE57). Все пациенты принимали лекарственные препараты из групп статинов, антигипертензивных препаратов и антикоагулянтов/дезаггегантов.

В результате экзомного секвенирования ДНК, выделенной из атеросклеротических бляшек сонных артерий, получено в среднем 55.3 (54.8-57.0) миллиона двусторонних прочтений, длиной 150 п.н. Всего в данных секвенирования ДНК обнаружено 867819 различных полиморфных вариантов (SNPs, INDEL) [153].

Полиморфизм в структуре зрелых микроРНК сильно влияет как на функцию данных микроРНК, так и на точность оценки их экспрессии. В связи с этим, параллельно с анализом нуклеотидной последовательности экзотов проводился анализ данных микроРНК секвенирования с целью извлечения информации о полиморфизмах. После проведения анализа, в данных секвенирования микроРНК обнаружено 742 SNPs. Из них с данными экзомного секвенирования пересекались 163 SNPs. При сравнении генотипов, идентифицированных с помощью обоих методов, без фильтрации по уровню покрытия, из 1141 парных наблюдений (163 варианта 7 образцов), 431 (38%) имело совпадающие генотипы, 88 (8%) – не совпадали, а остальные 54% имели хотя бы один не идентифицированный генотип в паре наблюдений. При фильтрации покрытия на уровне 10х, 118 генотипов совпадали, а 15 – не совпадали. Во всех несовпадающих парах гетерозиготная позиция при экзомном секвенировании ДНК определялась как гомозиготная при секвенировании микроРНК.

Результаты секвенирования микроРНК часто содержат адаптерные последовательности из-за малой длины микроРНК. Обычно при обработке результатов секвенирования происходит обрезка адаптеров, но при таком подходе теряется информация о реальном положении 5'-конца, а также может остаться фрагмент адаптера. В связи с этим, для подготовки данных микроРНК секвенирования мы предложили алгоритм AdaptMIR, который превращает наличие адаптера из недостатка в преимущество и позволяет более точно вырезать последовательности адаптера, фильтровать данные от плохих прочтений и проводить подсчёт уровня экспрессии микроРНК [199]. Алгоритм реализован на языке R. В качестве выравнивателя использовался BWA. Последовательности зрелых miRNA были получены из miRbase v. 22 [100].

Алгоритм AdaptMIR [199] состоит из нескольких этапов (Рисунок 23):

1. Создание квазиреференсной последовательности из зрелой микроРНК и адапторной последовательности.
2. Выравнивание прочтений, полученных в результате микроРНК секвенирования.
3. Селекция комплементарных прочтений.
4. Обрезка (тримминг) технических последовательностей (адаптеров).
5. Отбор последовательностей микроРНК.
6. Оценка уровня экспрессии зрелой микроРНК (опционально).

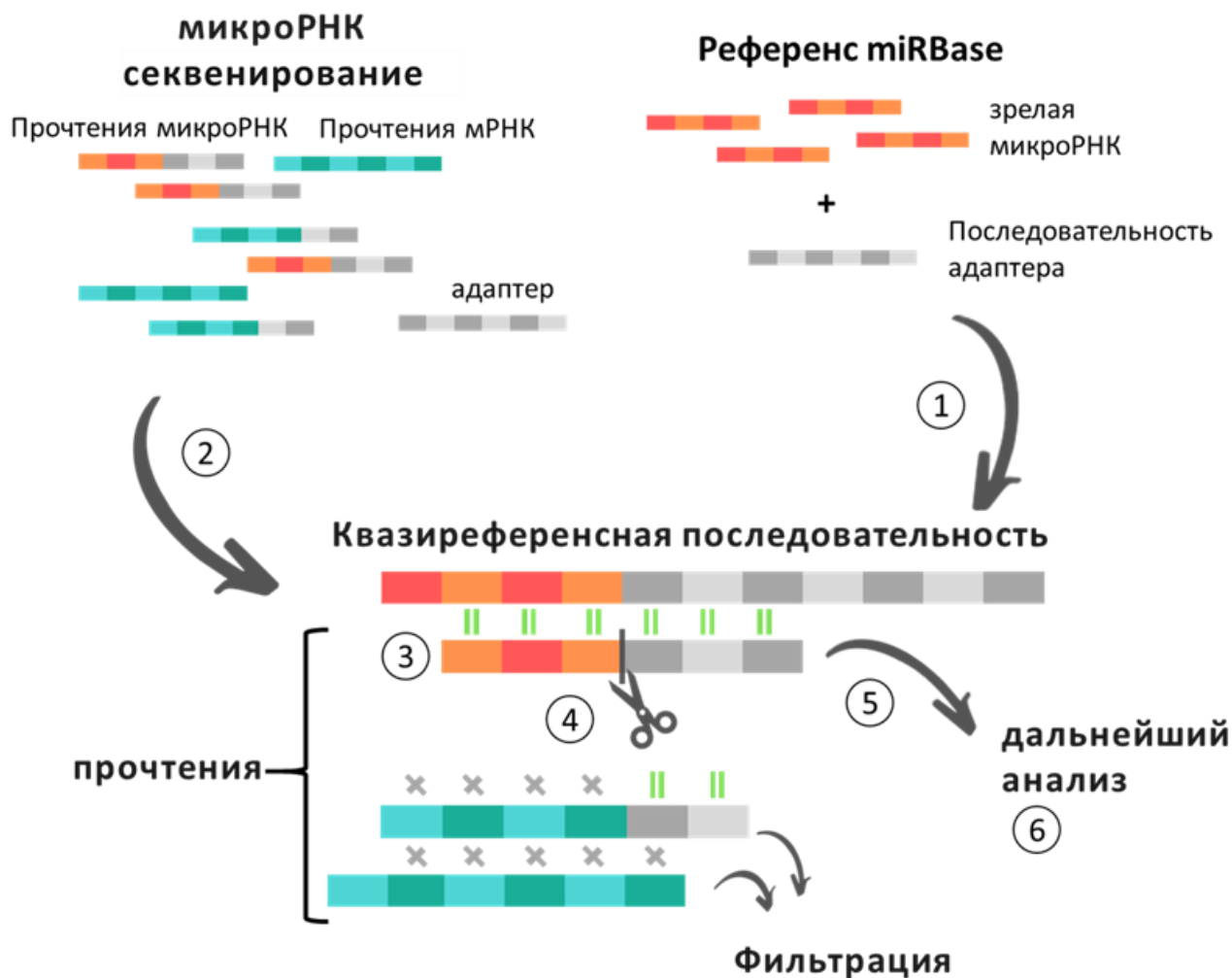


Рисунок 23 – Схема работы алгоритма AdaptMIR.

Для поиска связи выявленных полиморфизмов с атеросклерозом нами были сопоставлены данные о SNPs, полученные по результатам экзомного секвенирования ДНК и секвенирования микроРНК из атеросклеротических бляшек сонных артерий, с последующей аннотацией микроРНК. В результате идентифицировано 24 SNPs, локализованных в 18 генах микроРНК, которые являются кандидатами для анализа с точки зрения их функциональной значимости на регуляцию экспрессии соответствующих микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий (Таблица 17).

Из них 14 (58%) вариантов были частыми в популяции (MAF gnomAD > 5%). Частые варианты rs71428439 и rs2292832 расположены в области гена *MIR149*, а редкие варианты rs796224492, rs796361602, rs796973621, rs796153424, rs878994369 и rs796405877 – в гене *MIR10527*.

Таблица 17 – Спектр и характеристика SNPs в генах микроРНК, которые экспрессируются в атеросклеротических бляшках сонных артерий

dbSNP:ref/alt	Ген микроРНК	Генотип, кол-во пациентов	Уровень микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий (n=7)	Ассоциация с атеросклерозом и его осложнениями
rs776722712:C>T	<i>MIR186</i>	CC=7; CT=1	miR-186-5p=10.3 [9.4; 10.4]	АТ [200; 201]
rs4534339:C>T	<i>MIR1843</i>	TT=8	miR-1843=5 [4.8; 5.7]	-
rs71428439:A>G	<i>MIR149</i>	AA=7; AG=1	miR-149-5p=4.5 [4.1; 6]	ИМ [202]
rs2292832:T>C	<i>MIR149</i>	TC=5; CC=3	miR-149-5p=4.5 [4.1; 6]	ИИ [203;204]; ИМ [202]; АТ [205];
rs28645567:G>A	<i>MIR378D1</i>	GG=7; GA=1	miR-378d=3.8 [3.6; 4.4]	-
rs2910164:C>G	<i>MIR146A</i>	CC=1; CG=2; GG=5	miR-146a-5p=12.1 [11.8; 12.7]	ИИ [143;146; 206]; ИБС [146; 148];ИМ, [202]; АТ [207; 208]
rs76481776:C>T	<i>MIR182</i>	CC=7; CT=1	miR-182-5p=5.9 [5.1; 7.8]	АТ [209]
rs7911488:A>G	<i>MIR1307</i>	AA=4; AG=4	miR-1307-3p=8.1 [7.5; 8.4]; miR-1307-5p=6.3 [6.1; 6.7]	-
rs17091403:C>T	<i>MIR2110</i>	CC=7; CT=1	miR-2110=5.9 [5.4; 6.1]	-
rs796224492:T>C	<i>MIR10527</i>	TT=3; TC=5	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-
rs796361602:C>T	<i>MIR10527</i>	CC=3; CT=5	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-
rs796973621:C>T	<i>MIR10527</i>	CC=3; CT=5	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-
rs796153424:A>T	<i>MIR10527</i>	AA=3; AT=5	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-
rs878994369:T>C	<i>MIR10527</i>	TT=4; TC=4	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-

Продолжение Таблицы 17

dbSNP:ref/alt	Ген микроРНК	Генотип, кол-во пациентов	Уровень микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий (n=7)	Ассоциация с атеросклерозом и его осложнениями
rs796405877:G>A	<i>MIR10527</i>	GG=6; GA=2	miR-10527-5p=3.2 [3.0; 3.6]	-
rs2682818:A>C	<i>MIR618</i>	AA=1; AC=2; CC=5	miR-618=2.7 [1.6; 3.1]	ИИ [136]
rs75330474:C>T	<i>MIR323B</i>	CC=7; CT=1	miR-323b-3p=3.4 [2.1; 3.7]	-
rs41280052:G>T	<i>MIR184</i>	GG=8	miR-184=2.3 [1.6; 4.0]	-
rs6505162:A>C	<i>MIR423</i>	AA=3; AC=3; CC=2	miR-423-5p=12.1 [10.4; 12.3]; miR-423-3p=11.6 [10.8; 11.7];	ИБС [141]
rs745666:G>C	<i>MIR3615</i>	GG=4; GC=3; CC=1	miR-3615=6.1 [6.0; 7.1]	-
rs895819:T>C	<i>MIR27A</i>	TT=1; TC=6; CC=1	miR-27a-3p=12.9 [12.0; 13.3]; miR-27a-5p=7.9 [6.4; 8.0]	ИМ [142]; АТ [210]
rs3746444:A>G	<i>MIR499A</i>	AA=5; AG=2; GG=1	miR-499a-5p=4.5 [3.9; 4.9]	ИИ [148]; ИБС [148]; ИМ [138; 202]
rs199822597:G>A	<i>MIR363</i>	GG=6; AA=2	miR-363-3p=6.5 [5.7; 8.2]	АТ [211]
rs5907732:G>T	<i>MIR320D2</i>	GG=2; TT=6	miR-320d=3.4 [2.6; 5.3]	-

Примечание: dbSNP – согласно базе данных NCBI, ref/alt – референсный/альтернативный аллель. ИИ – ишемический инсульт, ИМ – инфаркт миокарда, АТ – атеросклероз.

Наибольшей потенциальной функциональной значимостью в отношении экспрессии микроРНК, предсказанной *in silico*, обладали rs776722712:C>T (*MIR186*), rs2910164:C>G (*MIR146A*), rs2682818:A>C (*MIR618*), rs3746444:A>G (*MIR499A*) и rs199822597:G>A (*MIR363*).

Наиболее высокая экспрессия микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий выявлена для 5 микроРНК: miR-27a-3p (12,9 [12,0; 13,3]), miR-146a-5p (15,9 [15,4; 16,2]), miR-423-5p (12,1 [10,4; 12,3]), miR-423-3p (11,6 [10,8; 11,7]) и miR-186-5p (10,3 [9,4; 10,4]); Рисунок 24).

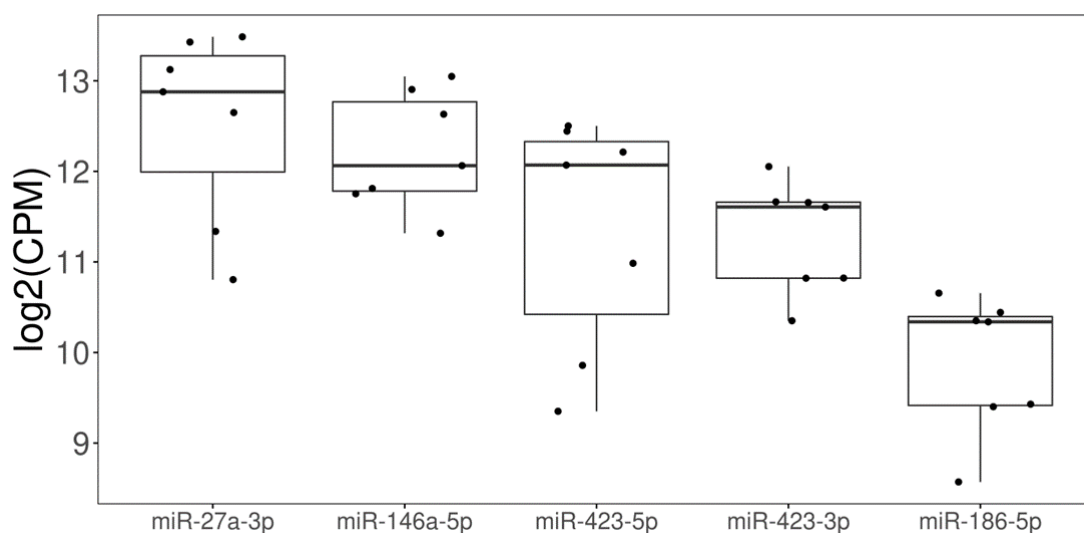


Рисунок 24 – Экспрессия miR-27a-3p, miR-146a-5p, miR-423-5p, miR-423-3p и miR-186-5p в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Экспериментальные исследования на культурах клеток *in vitro* показали вовлеченность miR-186-5p, miR-149-5p, miR-146a-5p, miR-182-5p, miR-27a-3p, miR-363-3p в развитие атеросклеротического поражения артерий [200; 201; 205; 207–210].

3.5.2 Связь полиморфизма в области генов микроРНК с их экспрессией в атеросклеротических бляшках сонных артерий

При анализе связи 24 SNPs, расположенных в области генов микроРНК, с уровнем экспрессии 19 микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий выявлено, что экспрессия miR-618 была в 27 раз выше в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с генотипом CC rs2682818 гена *MIR618* по сравнению с генотипом AC ($\log_2FC=4.8$; $p=0.012$; Рисунок 25). Полиморфизм rs2682818 может влиять на экспрессию miR-618, препятствуя формированию вторичной структуры шпильки и процессингу pre-miR-618 до его зрелой формы. Выявлено, что аллель A rs2682818 приводит к снижению уровня зрелой miR-618 по сравнению с аллелем C в клетках HeLa [212]. Кроме того показано, что генотипы AC/AA rs2682818 выступают в роли негативного прогностического фактора рецидива ишемического инсульта [136].

3.5.3 Анализ ассоциаций полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* с атеросклерозом сонных артерий и патогенетически значимыми признаками заболевания

Из всех микроРНК, высоко экспрессирующихся в атеросклеротических бляшках сонных артерий, наиболее хорошо изученной является miR-146a. Экспрессия miR-146a повышается в атеросклеротических бляшках человека и мыши, при этом данная микроРНК ингибирует передачу сигналов через NFκB в эндотелиальных клетках и в макрофагах путем интерференции с TRAF6 и IRAK1/2, тем самым снижая экспрессию провоспалительных цитокинов [44; 150; 207; 213–215]. Таким образом, miR-146a представляет собой противовоспалительную микроРНК, которая придает атеропротективные свойства стенке сосуда.

Для проведения анализа ассоциаций полиморфного варианта rs2910164 с атеросклерозом сонных артерий и патогенетически значимыми признаками заболевания использовалась ДНК лейкоцитов периферической крови, полученная от пациентов с атеросклерозом сонных артерий (n=112) и контрольной группы (n=72).

Распределение генотипов по полиморфному варианту rs2910164 гена *MIR146A* в группе контроля не показало отклонения от равновесия Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0.29$; $p > 0.05$).

Генетические варианты в пре-микроРНК затрагивают процессинг отдельных микроРНК и, соответственно, уменьшают или снижают уровень зрелой микроРНК. В частности, наиболее активно при атеросклерозе и его осложнениях исследовался вариант rs2910164:C>G. Однако анализ ассоциаций rs2910164 гена *MIR146A* с фенотипами атеросклероза сонных и коронарных артерий проведен, главным образом, в популяциях Азии. Лишь в одной из работ показана связь генотипа CC rs2910164 с риском рестеноза коронарных артерий у европейцев в популяции Германии [150]. Согласно данным gnomAD, существует различие MAF (C) rs2910164 между популяциями Восточной Азии и Европы – 63% и 23%, соответственно.

В связи с этим, в рамках настоящего исследования проведено генотипирование по полиморфному варианту rs2910164 гена *MIR146A* лейкоцитов крови пациентов с осложненным течением атеросклероза сонных артерий и относительно здоровых славян-жителей Западной Сибири (Таблица 18). При сравнении частот аллелей и генотипов данного полиморфизма между двумя группами выявлена ассоциация аллеля C и генотипов (CC+GC) rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий: ОШ=2.35; 95%ДИ:1.43-3.85; $p < 0.001$, ОШ=2.95 (95%ДИ:1.60-5.45; $p < 0.001$).

Таблица 18 – Распределение генотипов и частот аллелей полиморфного варианта полиморфного варианта rs2910164 (G>C) гена *MIR146A* в исследуемых группах

Полиморфный вариант rs2910164 (G>C)	Индивиды без клинически выраженного атеросклероза	Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом	Критерий χ^2 ; p-value
n	72	112	
Частота	абс. (%)	абс. (%)	
Генотипы GG	46 (63.9)	42 (37.5)	$\chi^2 = 11.20, p<0.001$
Генотипы GC	24 (33.3)	59 (52.7)	
Генотипы CC	2 (2.8)	11 (9.8)	
Аллели G	116 (80.5)	143 (63.8)	$\chi^2 = 10.96, p<0.001$
Аллели C	28 (19.5)	81 (36.2)	

Примечание: абс. – абсолютная частота.

При анализе ассоциации rs2910164 гена *MIR146A* с патогенетическими значимыми признаками заболевания и биохимическими параметрами (ИИ, степень стеноза сонных артерий, ИМ, ЭХОКГ параметров сердца, стенокардия, аритмия, степень хронической сердечной недостаточности, общий холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП), статистически значимая связь не была выявлена [216]. Однако образцы сонных артерий, имеющие различную долю лейкоцитарной инфильтрации, демонстрировали тенденцию к преобладанию генотипа GG в группе с высокой лейкоцитарной инфильтрацией (Рисунок 26).

При сравнении частот аллелей и генотипов rs2910164 гена *MIR146A* в контрольной группе здоровых индивидов (славян жителей Сибири) и других популяций мира, выявлено, что статистически значимыми были отличия в частоте генотипа CC в исследованной нами выборке здоровых индивидов по сравнению с контрольными выборками жителей Китая и Кореи ($p<0.001$, Рисунок 27а). Аналогичная ситуация наблюдалась при сравнении частоты аллеля C между данными группами (Рисунок 27б).

Следует отметить, что в популяциях Азии генотип CC rs2910164 (*MIR146A*) был связан с риском ИБС, но аллель G/генотип GG ассоциированы с риском осложненного течения атеросклероза сонных и коронарных артерий – ОНМК и ИМ [143; 146; 206]. В нашей работе установлена ассоциация аллеля C и генотипов (CC+GC) rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий у славян-жителей Западной

Сибири, однако связь с ОМНК остается неясной, поскольку острые сосудистые события регистрировались у 38 человек из общей выборки, что недостаточно для анализа.

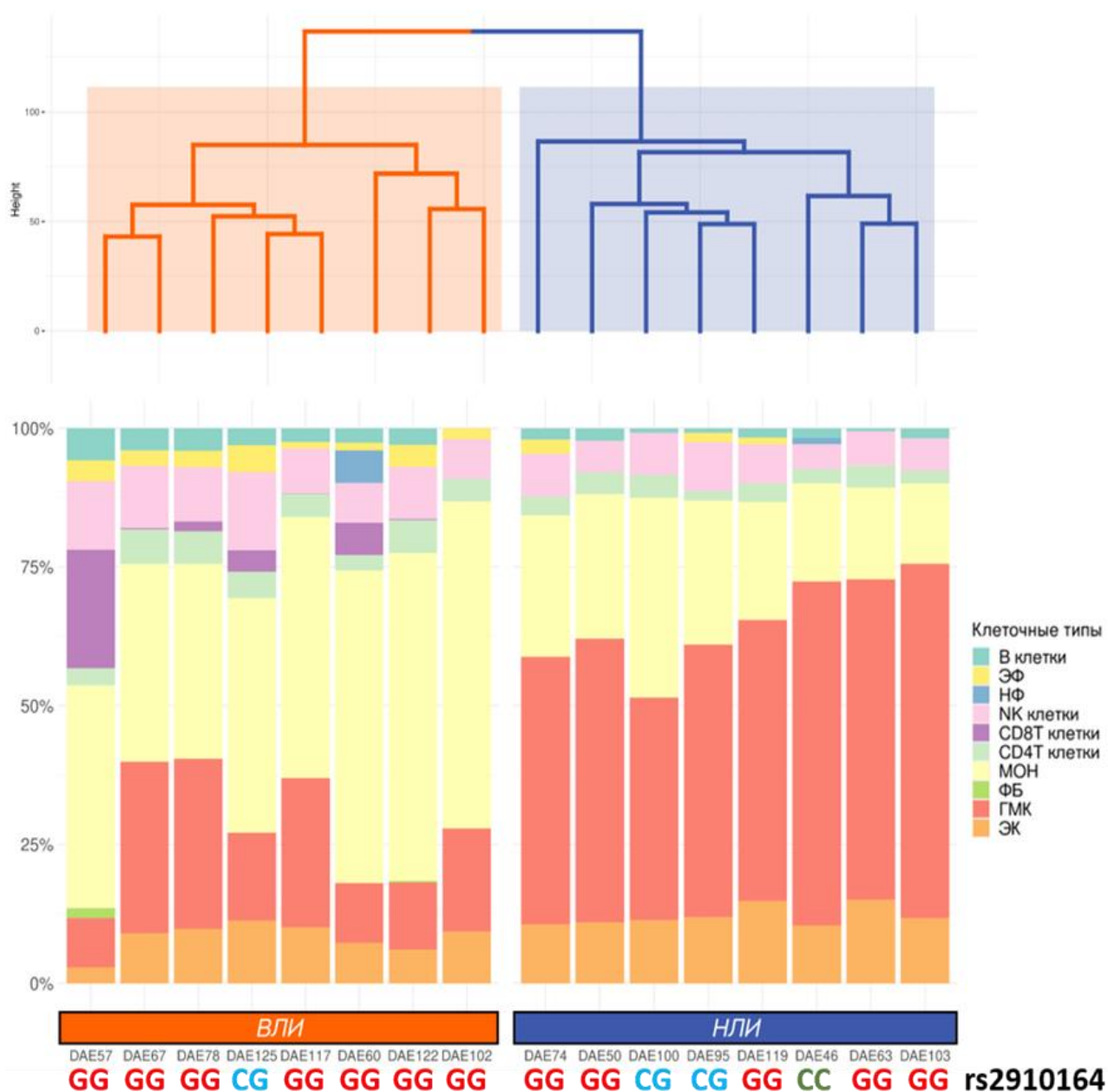


Рисунок 26 – Распределение генотипов rs2910164 гена *MIR146A* в группах пациентов в зависимости от степени лейкоцитарной инфильтрации атеросклеротических бляшек сонных артерий. Примечание: ВЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с высокой лейкоцитарной инфильтрацией, НЛИ - атеросклеротические бляшки сонных артерий с низкой лейкоцитарной инфильтрацией, НФ - нейтрофилы, ГМК - гладкомышечные клетки, ФБ фибробласты, ЭК - эндотелиальные клетки, ЭФ - эозинофилы, МОН – моноциты.

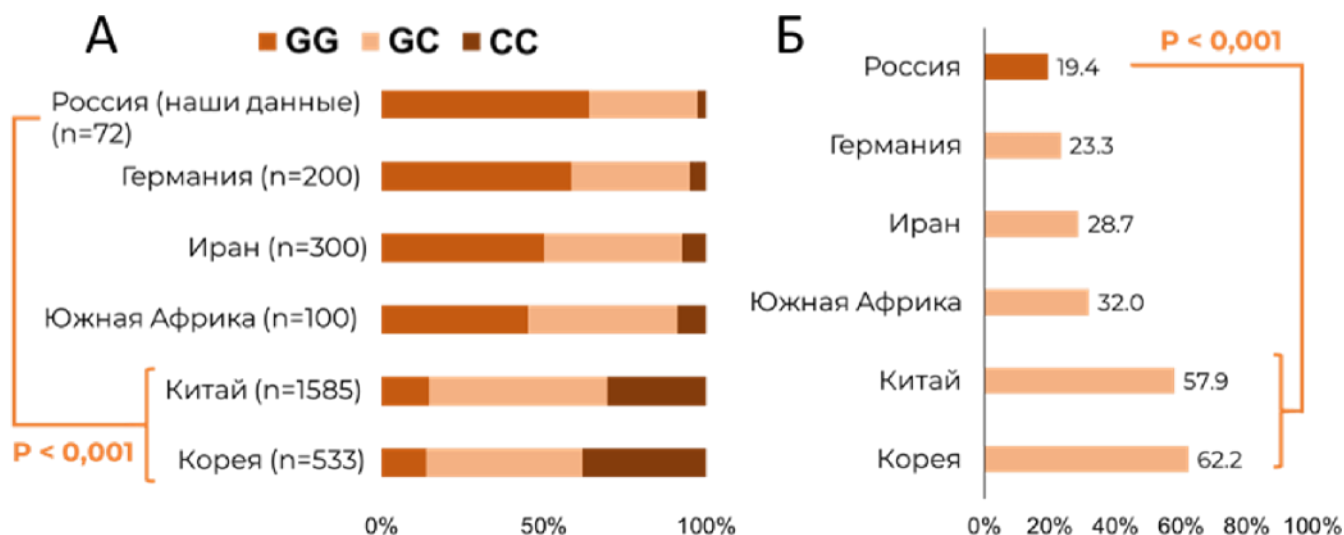


Рисунок 27 – Распределение частот генотипов (а) и частоты аллеля С (б) по полиморфному варианту rs2910164(G>C) гена *MIR146A* среди индивидов, здоровых в отношении сердечно-сосудистой патологии, в разных странах мира.

Полиморфизм rs2910164 приводит к замене нуклеотидов G>C в последовательности пре-микроРНК гена *MIR146A* и далее «пассажирской цепи» зрелой miR-146a-3p. В результате нарушается процессинг и конформация вторичной структуры pre-miR-146a и ее стабильности, уменьшается продукция зрелой miR-146a в клеточной линии U2OS [151]. В данной работе показано, что генотип CC и аллель С rs2910164 связаны со снижением экспрессии miR-146a в клетках, что увеличивает содержание мРНК ее мишеней (IRAK1, TRAF6), внося вклад в формирование провоспалительного профиля и, следовательно, риска заболевания.

Однако увеличение уровня miR-146a и снижение IRAK-1, TRAF-6, NF-kB и С-реактивного белка регистрировалось в мононуклеарных клетках периферической крови у пациентов с ИБС и генотипом CC rs2910164 по сравнению с таковыми и генотипом GG [214]. Кроме того, в работе Xiong et al., 2014 генотипы GC/CC rs2910164 были ассоциированы с риском развития ИБС и увеличением экспрессии miR-146a в мононуклеарных клетках крови пациентов [145]. В то же время при сахарном диабете 2 типа, который часто регистрируется у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий, наоборот, снижение уровня miR-146a в мононуклеарных клетках крови было связано с генотипом CC rs2910164 [217]. Однако в нашей работе не было выявлено связи экспрессии miR-146a-5p в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов зависимости от генотипа rs2910164 гена *MIR146A*. Возможно, существуют клеточно- и тканеспецифичные различия в экспрессии miR-146a у индивидов-носителей разных генотипов rs2910164 гена *MIR146A* в зависимости от стадии и русла атеросклеротического поражения артерий, коморбидного статуса пациентов.

С другой стороны, относительно малый размер выборок, используемый для анализа связи полиморфизма и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий, может быть причиной полученных различий в результатах между нашей и другими работами, что является ограничением проведенного исследования. Кроме того, необходимо реплицировать полученные результаты по ассоциации rs2910164 гена *MIR146A* с патологией на больших по размеру и разных по этническому составу выборках, в том числе включающих пациентов разного пола, с атеросклеротическим поражением артерий разной локализации и их осложнениями. Не исключено, что кумулятивный эффект не одного, а многих генетических вариантов, локализованных в области генов микроРНК, и факторов среды играет существенную роль в формировании предрасположенности к атеросклеротическому поражению артерий и это следует принимать во внимание в дальнейших исследованиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени с появлением новых молекулярно-генетических методов накоплен значительный объем данных о генетической структуре предрасположенности к многофакторным заболеваниям, в том числе атеросклерозу. Однако существенно меньшее количество работ посвящено расшифровке механизмов формирования и течения атеросклеротического поражения артерий.

Ассоциации генетических вариантов с заболеваниями и их патогенетически значимыми признаками могут быть противоречивыми в различных популяциях, что обуславливает необходимость репликации результатов таких работ в отдельных популяциях. Однонуклеотидные варианты, идентифицированные в результате GWAS, объясняют только лишь до 25% совокупного риска сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с атеросклерозом. Большинство генетических вариантов, ассоциированных с данной патологией, располагается в клеточно-специфичных, регуляторных элементах генома. По этой причине в последнее время достаточно большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в различных клетках, в том числе и в органах-мишенях заболеваний.

В частности, микроРНК представляют собой потенциальные биомаркеры осложненного течения атеросклероза и молекулярные мишени для терапии. В исследованиях, посвященных изучению экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках, чаще всего используется кандидатный подход [23] или микрочиповые технологии [24]. Однако эти подходы позволяют проанализировать только уже известные микроРНК и не дают возможность оценить полиморфизмы в структуре зрелой микроРНК. Массовое параллельное секвенирование микроРНК (miRNA-seq) как технология свободна от этих недостатков.

В настоящем исследовании впервые с использованием данной технологии проведена оценка профилей экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек и подлежащих относительно интактных частях сонных артерий, полученных от одних и тех же пациентов с клиническим выраженным атеросклерозом. Всего в сонных артериях обнаружено 352 микроРНК, из которых наиболее высоко экспрессирующимися являются miR-21-5p и miR-143-3p. Эти две микроРНК активно изучаются в отношении прогнозирования осложненного течения атеросклероза и мишеней для терапии [104]. Более того, считается, что miR-21 является специфичным биомаркером «симптоматических» бляшек сонных артерий, ассоциированных с осложнениями [218].

При сравнении уровней экспрессии микроРНК между образцами атеросклеротических бляшек и интактными частями сонных артерий выявлено 125 дифференциально-экспрессирующихся микроРНК ($|\log_2FC| > 1$ и $FDR < 0.05$). Данные микроРНК в значительной степени пересекаются с микроРНК, вовлечёнными в развитие атеросклероза, согласно

информации, предоставленной в базе HMDD. Однако для 77 (62%) микроРНК, различающихся по уровню экспрессии между образцами атеросклеротических бляшек и интактными частями сонных артерий, потенциальная связь с атеросклерозом установлена впервые. Следует отметить, что некоторые из дифференциально-экспрессирующихся микроРНК (miR-145, miR-146a) уже сейчас считаются перспективными биомаркерами или потенциальными мишенями для терапии ССЗ [104; 118].

Функциональная аннотация 125 микроРНК, различающихся по уровню экспрессии между клетками атеросклеротических бляшек и интактных частей сонных артерий, подчеркивает их широкую сферу компетенции и плеiotропное влияние в отношении заболеваний, а также в регуляции многих генов-мишеней и сигнальных путей, в том числе действуя через факторы транскрипции в определенных типах клеток. В частности, 54 микроРНК, которые имели увеличение экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих интактных частей сонных артерий, связаны с несколькими группами заболеваний. Это патология сердечно-сосудистой системы и мышц, что подтверждается также связью этих микроРНК с факторами транскрипции, регулирующими развитие миоцитов (MYOG, MYOD, MYF5, MRF4, CALCINEURIN). Не исключено, что в клетках атеросклеротических бляшек микроРНК регулируют функцию гладкомышечных клеток.

Вторая группа заболеваний, с которыми ассоциированы дифференциально экспрессированные микроРНК – злокачественные новообразования (хондрома, карциномы) и связь микроРНК с транскрипционными факторами клеточного цикла, пролиферации и апоптоза (TP73, TNFSF12, SMAD4). Это может отражать влияние микроРНК на пролиферацию клеток в атеросклеротических бляшках, а также хондроцитарную дифференцировку гладкомышечных клеток и кальцификацию атеросклеротических бляшек [219].

Инфекционно-воспалительные заболевания (воспаление раны, сепсис, инфекция микобактерией туберкулеза) – еще одна группа патологий, с которыми функционально аннотируются микроРНК с увеличением экспрессии в клетках атеросклеротических бляшек относительно подлежащих интактных частей сонных артерий. По-видимому, это отражает тесную связь микроРНК с воспалительным процессом через путь передачи Toll-подобных рецепторов в иммунных клетках атеросклеротических бляшек.

Помимо этого, в настоящем исследовании показано, что клеточный состав является значимым компонентом, который вносит вклад в дифференциальную экспрессию микроРНК в клетках сонных артерий, как интактных, так пораженных атеросклерозом. Причем, биоинформатически прогнозируемый клеточный состав атеросклеротических бляшек сонных артерий, рассчитанный на основании экспрессии микроРНК, отличается от интактных тканей.

Так, в результате использования разработанного алгоритма деконволюции клеточного состава сонных артерий на основании профиля экспрессии микроРНК, выявлено, что интактные части тканей содержат существенную долю гладкомышечных клеток и фибробластов (37-52%), нейтрофилов (31-35%) и В-клеток (17-30%), а эндотелиальные клетки (0-0.1%) и Т- и НК-клеточный компонент (0.2-1%) представлены минорно. Атеросклеротические бляшки характеризуются более высокой биоинформатически прогнозируемой долей Т- и НК-клеток (4-12%) и меньшим процентом В-клеток (5-16%). Макрофагальный компонент (1-5%) обнаруживается только в пораженных атеросклерозом сонных артериях.

Коэкспрессионный анализ микроРНК в клетках сонных артерий подтвердил тесную связь микроРНК друг с другом и зависимость уровня их экспрессии от прогнозируемой доли клеточных компонент и степени поражения артерий атеросклерозом. В частности, для одного из модулей коэкспрессированных микроРНК, который включал 75 микроРНК, показана положительная корреляция с В-клетками и нейтрофилами ($Rho=0.95$ и $p=0.00004$; $Rho=0.68$ и $p=0.03$; соответственно), но отрицательная корреляция с их атеросклеротическим поражением ($Rho=-0.87$ и $p=0.001$). Аннотация данных коэкспрессируемых микроРНК показала их ассоциацию с отдельными сердечно-сосудистыми и воспалительными болезнями (мерцательной аритмией и легочным саркоидозом), регуляцией циркадных ритмов, функционированием иммунной системы, связью с транскрипционными факторами (STAT5 и E2F1).

Другой модуль, включающий 111 микроРНК, положительно коррелировал как с Т- и НК-клетками, макрофагами, гладкомышечными клетками и фибробластами ($Rho=0.91-0.75$ и $p<0.05$), так и с атеросклеротическим поражением сосуда ($Rho=0.87$ и $p=0.001$). Функционально данные микроРНК связаны с отдельными воспалительными и онкологическими заболеваниями, а также дифференцировкой нервных стволовых клеток.

Хотя микроРНК показывают себя как потенциально информативные биомаркеры заболевания, становится всё более очевидным, что изучение патологического процесса только на одном уровне организации (геномном, метиломном, транскриптомном) позволяет объяснить, лишь небольшую часть наблюдаемых процессов. В настоящее время, с распространением технологий секвенирования и микрочипового анализа, появилась возможность изучать как структурный уровень организации генома, так и различные регуляторные процессы (метилирование ДНК, экспрессия микроРНК), происходящие в поражённой ткани в одних и тех же образцах. Объединение информации из разных молекулярных уровней получило название – мультиомика. Данный подход позволяет усилить данные одного типа другими, найти новые взаимодействия и учитывать взаимные ковариаты при анализе.

В настоящем исследовании проведена оценка профилей метилирования ДНК, экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий и экзомное секвенирование

лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же пациентов с клинически выраженным атеросклерозом.

Деконволюция клеточного состава сонных артерий, проведенная с использованием данных метилирования ДНК, выявила изменение клеточного состава при рестенозе и в случае симптоматической атеросклеротической бляшки. Выявлено, что рестеноз артерий характеризуется большей долей иммунных клеток (особенно CD8-Т-клеток) и меньшей – ГМК и эндотелиальных клеток, а также наличием фибробластов, а в случае симптоматической атеросклеротической бляшки регистрируется большая доля нейтрофилов.

Кроме того, обнаружена кластеризация образцов сонных артерий в зависимости от биоинформатически прогнозируемой доли иммунных клеток, рассчитанной на основании как метилирования ДНК, так и экспрессии микроРНК. При сравнении атеросклеротических бляшек с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией обнаружено 42643 дифференциально-метилированных CpG-сайтов ($\Delta\text{-Beta} > 0.20$ и $\text{FDR} < 0.05$) и 51 дифференциально-экспрессированных микроРНК ($|\log_2\text{FC}| > 1$ и $\text{FDR} < 0.05$).

Идентифицировано 18 дифференциально-экспрессированных микроРНК между интактными сонными артериями, которые также были дифференциально-экспрессированы между атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией ($|\log_2\text{FC}| > 1$ и $\text{FDR} < 0.05$). Среди них уровень экспрессии miR-326 показал корреляцию с уровнем метилирования расположенных рядом CpG-сайтов (cg08960830, $r = -0.78$, $p = 0.002$; cg25899829 $r = -0.76$, $p = 0.002$). С другой стороны, в атеросклеротических бляшках сонных артерий miR-126-3p, miR-148a-3p и miR-155-5p являются высоко экспрессирующимися и потенциально могут регулировать DNMT1 и MECP2. Это позволяет предположить тесную взаимосвязь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий.

Экзомное секвенирование лейкоцитов периферической крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий, проведённое в данном исследовании, позволило выявить полиморфизмы в структуре зрелой микроРНК. В данных микроРНК секвенирования атеросклеротических бляшек сонных артерий тех же пациентов обнаружено 742 SNPs, из них с данными экзомного секвенирования пересекались 163 SNPs. Однако только для 24 SNPs, локализованных в 18 генах микроРНК, был с достаточным качеством зафиксирован и полиморфизм, и экспрессия целевой микроРНК для проведения анализа связи SNPs с уровнем экспрессии микроРНК. Было выявлено, что экспрессия miR-618 была в 27 раз выше в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с генотипом CC rs2682818 гена *MIR618* по сравнению с генотипом AC ($\log_2\text{FC} = 4.8$; $p = 0.012$).

В результате настоящего исследования впервые установлена ассоциация полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития атеросклероза сонных артерий у славян

жителей западной Сибири. Аллель С и генотипы (GC+CC) данного варианта связаны с риском развития атеросклероза сонных артерий: ОШ=2.35 (95%ДИ:1.43-3.85; $p<0.001$), ОШ=2.95 (95%ДИ:5.03-32.48; $p<0.001$) соответственно. Однако ассоциации rs2910164 гена *MIR146A* с экспрессией данной микроРНК в клетках сонных артерий и патогенетически значимыми признаками заболевания не выявлено.

Также в результате данного исследования был разработан алгоритм для качественной подготовки данных микроРНК секвенирования, позволяющий более точно удалять последовательности адаптера, фильтровать данные от плохих прочтений и проводить подсчёт уровня экспрессии микроРНК (AdaptMIR). Данный алгоритм может быть использован для более качественного извлечения информации о генотипах из данных микроРНК секвенирования [199].

Таким образом, проведенное исследование расширяет имеющиеся представления о молекулярных механизмах атеросклероза, дополняя их новыми эпигенетическими компонентами и их взаимосвязью. Работа подчеркивает значительный вклад клеточного компонента в измеряемые уровни экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в тканях артерий, а также предлагает подходы для анализа и коррекции существующей клеточной гетерогенности образцов, что позволяет изучать сложные молекулярные механизмы регуляции активности генов, происходящие в атеросклеротической бляшке.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом в образцах сонных артерий выявлена экспрессия 352 микроРНК (18% из 1917 известных микроРНК человека, представленных в базе miRbase v.22) и среди которых наиболее высоко экспрессирующимися являются miR-21-5p ($\log_2\text{CPM}=17.17$) и miR-143-3p ($\log_2\text{CPM}=17.32$).
2. Между образцами атеросклеротических бляшек и интактными частями сонных артерий изменения в экспрессии $|\log_2\text{FC}| > 1$ выявлены для 125 микроРНК ($\text{FDR} < 0.05$), которые имеют 1371 генов-мишеней и действуют через факторы транскрипции ERS1, E2F1, TNFSF12, MYOGENIN, MYOD, MYF5, MRF4, TP73, SMAD4, MYOG и CALCINEURIN в гладкомышечных и иммунных клетках, а также связаны с патологией сердечно-сосудистой системы и мышц, онкологическими и инфекционно-воспалительными заболеваниями.
3. Биоинформатически прогнозируемый клеточный состав атеросклеротических бляшек сонных артерий, рассчитанный на основании экспрессии микроРНК, отличается от интактных тканей. Макрофагальный компонент (1-5%) обнаруживается только в пораженных атеросклерозом сонных артериях. Атеросклеротические бляшки характеризуются более высокой биоинформатически прогнозируемой долей Т- и НК-клеток (4-12%) и меньшим процентом В-клеток (5-16%).
4. Структура кластеров коэкспрессирующихся микроРНК в клетках сонных артерий подтверждает тесную связь микроРНК друг с другом и зависит от прогнозируемой доли клеточных компонент и степени поражения артерий атеросклерозом. Выявлено, что модуль, включающий 111 коэкспрессирующихся микроРНК, положительно коррелирует как с Т- и НК-клетками, макрофагами, гладкомышечными клетками и фибробластами ($\rho=0.91-0.75$ и $p<0.05$), так и с их атеросклеротическим поражением ($\rho=0.87$ и $p=0.001$).
5. Образцы сонных артерий кластеризуются в зависимости от биоинформатически прогнозируемой доли иммунных клеток, рассчитанной на основании как специфичности метилирования ДНК, так и экспрессии микроРНК. Между атеросклеротическими бляшками с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией имеется 42643 дифференциально-метилированных CpG-сайтов ($|\Delta\text{-Beta}| > 0.20$ и $\text{FDR} < 0.05$) и 51 дифференциально-экспрессированная микроРНК ($|\log_2\text{FC}| > 1$ и $\text{FDR} < 0.05$).
6. Уровень экспрессии miR-326, различающийся между интактными сонными артериями и группами атеросклеротических бляшек с различной долей лейкоцитарного компонента ($\log_2\text{FC}=1.17$ и $\text{FDR}=0.0039$, $\log_2\text{FC}=2.83$ и $\text{FDR}=0.0005$), коррелирует с уровнем метилирования расположенных рядом CpG-сайтов (cg08960830, $\rho=-0.78$, $p=0.002$, cg25899829 $\rho=-0.76$, $p=0.002$). Высоко экспрессирующиеся miR-126-3p, miR-148a-3p и miR-155-5p в атеросклеротических бляшках сонных артерий потенциально могут регулировать

DNMT1 и MECP2, объясняя их дифференциальную экспрессию между пораженными и интактными артериями, что подчёркивает тесную взаимосвязь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК.

7. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий идентифицировано 24 однонуклеотидных варианта, локализованных в 18 генах микроРНК, которые экспрессируются до зрелого состояния в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Показана связь генотипа CC rs2682818 гена *MIR618* с увеличением экспрессии miR-618 по сравнению с генотипом AC ($\log_2FC=4.8$; $p=0.012$). Установлена ассоциация полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинического выраженного атеросклероза сонных артерий у жителей западной Сибири славянской национальности. Аллель С и генотипы (GC+CC) данного варианта связаны с риском развития данной патологии (ОШ=2.35 (95%ДИ:1.43-3.85; $p<0.001$), ОШ=2.95 (95%ДИ:1.60-5.45; $p<0.001$), соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВОЗ : Сердечно-сосудистые заболевания [Электронный ресурс] [Текст]. — URL: <https://www.who.int/ru/health-topics/cardiovascular-diseases>.
2. Федеральная служба государственной статистики (Росстат) [Электронный ресурс] [Текст]. — URL: <https://rosstat.gov.ru/>.
3. Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study [Текст] / P. Song [et al.] // The Lancet Global Health. — 2020. — May. — Vol. 8, no. 5. — e721—e729. — URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30117-0](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30117-0).
4. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease [Текст] / W. Herrington [et al.] // Circulation Research. — 2016. — Feb. 19. — Vol. 118, no. 4. — P. 535—546. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611>.
5. Atherosclerosis [Текст] / P. Libby [et al.] // Nature Reviews Disease Primers. — 2019. — Aug. 16. — Vol. 5, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-019-0106-z>.
6. Pasterkamp, G. Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease [Текст] / G. Pasterkamp, H. den Ruijter, P. Libby // Nature Reviews Cardiology. — 2016. — Oct. 20. — Vol. 14, no. 1. — P. 21—29. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2016.166>.
7. Дзизинский, А. А. Наследственность и атеросклероз [Текст] / А. А. Дзизинский, В. П. Пузырев. — 1977.
8. Carotid Artery Atherosclerosis: A Review on Heritability and Genetics [Текст] / B. Forgo [et al.] // Twin Research and Human Genetics. — 2018. — July 6. — Vol. 21, no. 5. — P. 333—346. — URL: <http://dx.doi.org/10.1017/thg.2018.45>.
9. Khera, A. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation [Текст] / A. Khera, S. Kathiresan // Nature Reviews Genetics. — 2017. — Mar. 13. — Vol. 18, no. 6. — P. 331—344. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2016.160>.
10. Kovacic, J. Unraveling the Complex Genetics of Coronary Artery Disease ? [Текст] / J. Kovacic // Journal of the American College of Cardiology. — 2017. — Feb. — Vol. 69, no. 7. — P. 837—840. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.007>.
11. Majid Nikpay Anuj Goel, H. L. C. S. D. T. C. J. T. L. A comprehensive 1000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease [Текст] / H. L. C. S. D. T. C. J. T. L. Majid Nikpay Anuj Goel // Nature Genetics. — 2015. — Sept. 7. — Vol. 47, no. 10. — P. 1121—1130. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3396>.

12. Low-frequency and common genetic variation in ischemic stroke [Текст] / R. Malik [et al.] // *Neurology*. — 2016. — Mar. 2. — Vol. 86, no. 13. — P. 1217—1226. — URL: <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000002528>.
13. Shared Genetic Susceptibility to Ischemic Stroke and Coronary Artery Disease [Текст] / M. Dichgans [et al.] // *Stroke*. — 2014. — Jan. — Vol. 45, no. 1. — P. 24—36. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.113.002707>.
14. Contribution of Gene Regulatory Networks to Heritability of Coronary Artery Disease [Текст] / L. Zeng [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. — 2019. — June. — Vol. 73, no. 23. — P. 2946—2957. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2019.03.520>.
15. New Mechanisms of Vascular Dysfunction in Cardiometabolic Patients: Focus on Epigenetics [Текст] / S. Ambrosini [et al.] // *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention*. — 2020. — Aug. 1. — Vol. 27, no. 5. — P. 363—371. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s40292-020-00400-2>.
16. The role of epigenetic modifications in cardiovascular disease: A systematic review [Текст] / T. Muka [et al.] // *International Journal of Cardiology*. — 2016. — June. — Vol. 212. — P. 174—183. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.03.062>.
17. Association between DNA methylation and coronary heart disease or other atherosclerotic events: A systematic review [Текст] / A. Fernández-Sanlés [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2017. — Aug. — Vol. 263. — P. 325—333. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.022>.
18. Blood Leukocyte DNA Methylation Predicts Risk of Future Myocardial Infarction and Coronary Heart Disease [Текст] / G. Agha [et al.] // *Circulation*. — 2019. — Aug. 20. — Vol. 140, no. 8. — P. 645—657. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039357>.
19. Zhong, J. The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease [Текст] / J. Zhong, G. Agha, A. Baccarelli // *Circulation Research*. — 2016. — Jan. 8. — Vol. 118, no. 1. — P. 119—131. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.305206>.
20. Smoking is Associated to DNA Methylation in Atherosclerotic Carotid Lesions [Текст] / M. Siemeling [et al.] // *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. — 2018. — Sept. — Vol. 11, no. 9. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.002030>.
21. Aberrant DNA methylation and miRNAs in coronary artery diseases and stroke: a systematic review [Текст] / A. Sharma [et al.] // *Briefings in Functional Genomics*. — 2020. — Jan. 17. — Vol. 19, no. 4. — P. 259—285. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/bfpg/elz043>.
22. Circulatory MicroRNAs as Potential Biomarkers for Stroke Risk [Текст] / M. Mens [et al.] // *Stroke*. — 2021. — Mar. — Vol. 52, no. 3. — P. 945—953. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.031543>.

23. Epigenetics of Atherosclerosis: Emerging Mechanisms and Methods [Текст] /N. Khyzha [et al.] // Trends in Molecular Medicine. — 2017. — Apr. — Vol. 23, no. 4. — P. 332—347. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.004>.
24. Epigenetic-related therapeutic challenges in cardiovascular disease [Текст] / C. Schiano [et al.] // Trends in Pharmacological Sciences. — 2015. — Apr. — Vol. 36, no. 4. — P. 226—235. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2015.02.005>.
25. Pathogenesis of Ischemic Stroke: Role of Epigenetic Mechanisms [Текст] /R. Stanzione [et al.] // Genes. — 2020. — Jan. 13. — Vol. 11, no. 1. — P. 89. — URL: <http://dx.doi.org/10.3390/genes11010089>.
26. The Role of DNA Methylation in Ischemic Stroke: A Systematic Review [Текст] / M. Zeng [и др.] // Frontiers in Neurology. — 2020. — 27 окт. — Т. 11. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2020.566124>.
27. Xu, S. Atherosclerosis Is an Epigenetic Disease [Текст] / S. Xu, J. Pelisek, Z. Jin // Trends in Endocrinology and Metabolism. — 2018. — Nov. — Vol. 29, no. 11. — P. 739—742. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2018.04.007>.
28. Королёва, Ю. Роль микроРНК в формировании нестабильности атеросклеротических бляшек [Текст] / Ю. Королёва, М. Назаренко, А. Кучер // Биохимия. — 2018. — Т. 83, № 1. — С. 34—46.
29. The Involvement of miRNA in Carotid-Related Stroke [Текст] / P. Maitrias [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. — 2017. — Sept. — Vol. 37, no. 9. — P. 1608—1617. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309233>.
30. A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis [Текст] / H. Stary [et al.] // Circulation. — 1995. — Sept. — Vol. 92, no. 5. — P. 1355—1374. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.92.5.1355>.
31. Wang, H. Crosstalk of Genetic Variants, Allele-Specific DNA Methylation, and Environmental Factors for Complex Disease Risk [Текст] / H. Wang, D. Lou, Z. Wang // Frontiers in Genetics. — 2019. — 9 янв. — Т. 9. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2018.00695>.
32. SNPs in Sites for DNA Methylation, Transcription Factor Binding, and miRNA Targets Leading to Allele-Specific Gene Expression and Contributing to Complex Disease Risk: A Systematic Review [Текст] / M. Vohra [et al.] // Public Health Genomics. — 2020. — Vol. 23, no. 5/6. — P. 155—170. — URL: <http://dx.doi.org/10.1159/000510253>.
33. Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis [Текст] / J. Gong [et al.] // Human Mutation. — 2011. — Nov. 23. — Vol. 33, no. 1. — P. 254—263. — URL: <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21641>.

34. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse [Текст] / D. de Rie [et al.] // *Nature Biotechnology*. — 2017. — Aug. 21. — Vol. 35, no. 9. — P. 872—878. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3947>.
35. Wang, S. Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers [Текст] / S. Wang, W. Wu, F. Claret // *Epigenetics*. — 2017. — Feb. 6. — Vol. 12, no. 3. — P. 187—197. — URL: <http://dx.doi.org/10.1080/15592294.2016.1273308>.
36. Methylation of Human MicroRNA Genes in Normal and Neoplastic Cells [Текст] / B. Weber [et al.] // *Cell Cycle*. — 2007. — May 2. — Vol. 6, no. 9. — P. 1001—1005. — URL: <http://dx.doi.org/10.4161/cc.6.9.4209>.
37. Morales, S. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression [Текст] / S. Morales, M. Monzo, A. Navarro // *Biomolecular Concepts*. — 2017. — 20 дек. — Т. 8, № 5/6. — С. 203—212. — URL: <http://dx.doi.org/10.1515/bmc-2017-0024>.
38. Sun, Y. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases [Текст] / Y. Sun, Y. Hu // — Elsevier, 2016. — С. 147—190. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.004>.
39. Integration of Transformative Platforms for the Discovery of Causative Genes in Cardiovascular Diseases [Текст] / H. Lu [et al.] // *Cardiovascular Drugs and Therapy*. — 2021. — Apr. 15. — Vol. 35, no. 3. — P. 637—654. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10557-021-07175-1>.
40. Akiyama, M. Multi-omics study for interpretation of genome-wide association study [Текст] / M. Akiyama // *Journal of Human Genetics*. — 2020. — Sept. 18. — Vol. 66, no. 1. — P. 3—10. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s10038-020-00842-5>.
41. Multi-Omics Analysis Reveals MicroRNAs Associated With Cardiometabolic Traits [Текст] / M. Mens [и др.] // *Frontiers in Genetics*. — 2020. — 27 февр. — Т. 11. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2020.00110>.
42. Interaction Between microRNA and DNA Methylation in Atherosclerosis [Текст] / J. Tao [et al.] // *DNA and Cell Biology*. — 2021. — Jan. 1. — Vol. 40, no. 1. — P. 101—115. — URL: <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2020.6138>.
43. Raitoharju, E. MicroRNAs in the Atherosclerotic Plaque [Текст] / E. Raitoharju, N. Oksala, T. Lehtimäki // *Clinical Chemistry*. — 2013. — Dec. 1. — Vol. 59, no. 12. — P. 1708—1721. — URL: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2013.204917>.
44. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study [Текст] / E. Raitoharju [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2011. — Nov. — Vol. 219, no. 1. — P. 211—217. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.020>.

45. microRNA expression signatures and parallels between monocyte subsets and atherosclerotic plaque in humans [Текст] / B. Denecke [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. — 2012. — Vol. 107, no. 04. — P. 619—625. — URL: <http://dx.doi.org/10.1160/TH11-09-0607>.
46. Differential Expression of MicroRNAs in Endarterectomy Specimens Taken from Patients with Asymptomatic and Symptomatic Carotid Plaques [Текст] / B. Markus [et al.] // *PLOS ONE* / ed. by E. Aikawa. — 2016. — Sept. 15. — Vol. 11, no. 9. — e0161632. — URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0161632>.
47. Next generation MicroRNA sequencing to identify coronary artery disease patients at risk of recurrent myocardial infarction [Текст] / S. Kanuri [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2018. — Nov. — Vol. 278. — P.232—239.—URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.09.021>.
48. Extensive demethylation of normally hypermethylated CpG islands occurs in human atherosclerotic arteries [Текст] / S. Castillo-Diaz [и др.] // *International Journal of Molecular Medicine*. — 2010. — 21 сент. — Т. 26, № 5. — URL: http://dx.doi.org/10.3892/ijmm_00000515.
49. Профиль метилирования ДНК в области атеросклеротических бляшек человека [Текст] / Назаренко, МС [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2011. — Т. 45, № 4. — С. 610—616.
50. Профиль метилирования ДНК в тканях сосудистого русла при атеросклерозе [Текст] / Назаренко, МС [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2013. — Т. 47, № 3. — С. 398—398.
51. DNA Methylation Map of Human Atherosclerosis [Текст] / S. Zaina [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. — 2014. — Oct. — Vol. 7, no. 5. — P. 692—700. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000441>.
52. Identification of hypo- and hypermethylated genes related to atherosclerosis by a genome-wide analysis of DNA methylation [Текст] / Y. YAMADA [et al.] // *International Journal of Molecular Medicine*. — 2014. — Mar. 10. — Vol. 33, no. 5. — P. 1355—1363. — URL: <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1692>.
53. Global DNA methylation analysis of human atherosclerotic plaques reveals extensive genomic hypomethylation and reactivation at imprinted locus 14q32 involving induction of a miRNA cluster [Текст] / E. Aavik [et al.] // *European Heart Journal*. — 2014. — Nov. 16. — Vol. 36, no. 16. — P. 993—1000. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehu437>.
54. A Comparison of Genome-Wide DNA Methylation Patterns between Different Vascular Tissues from Patients with Coronary Heart Disease [Текст] / M. Nazarenko [et al.] // *PLOS ONE* / ed. by A. Sawalha. — 2015. — Apr. 9. — Vol. 10, no. 4. — e0122601. — URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122601>.

55. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression [Текст] / M. Valencia-Morales [et al.] // BMC Medical Genomics. — 2015. — Feb. 27. — Vol. 8, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s12920-015-0085-1>.
56. DNA Methylation Dynamics in Human Carotid Plaques After Cerebrovascular Events [Текст] / S. Zaina [et al.] // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. — 2015. — Aug. — Vol. 35, no. 8. — P. 1835—1842. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305630>.
57. Identification of novel hyper- or hypomethylated CpG sites and genes associated with atherosclerotic plaque using an epigenome-wide association study [Текст] / Y. Yamada [и др.] // International Journal of Molecular Medicine. — 2018. — 2 февр. — URL: <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2018.3453>.
58. Integrated Analysis of Microarray Data of Atherosclerotic Plaques: Modulation of the Ubiquitin-Proteasome System [Текст] / Z. Wang [et al.] // PLoS ONE / ed. by M. Campbell. — 2014. — Oct. 15. — Vol. 9, no. 10. — e110288. — URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0110288>.
59. Methylation-induced downregulation and tumor-suppressive role of microRNA-98 in glioma through targeting Sal-like protein 4 [Текст] / Z. Xia [и др.] // International Journal of Molecular Medicine. — 2018. — 6 февр. — URL: <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2018.3464>.
60. Марков, АВ. Метилирование ДНК и атеросклероз [Текст] / Марков, АВ, Назаренко, МС // ГЕНЕТИКА ЧЕЛОВЕКА И ПАТОЛОГИЯ Проблемы эволюционной медицины. — 2014. — С. 133.
61. Tabas, I. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis [Текст] / I. Tabas, G. García-Cardena, G. Owens // Journal of Cell Biology. — 2015. — Apr. 13. — Vol. 209, no. 1. — P. 13—22. — URL: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201412052>.
62. Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals [Текст] / C. Rhee [et al.] // JAMA Network Open. — 2019. — Feb. 15. — Vol. 2, no. 2. — e187571. — URL: <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.7571>.
63. Genome-Wide Significant Loci: How Important Are They? [Текст] / J. Björkegren [et al.] // Journal of the American College of Cardiology. — 2015. — Mar. — Vol. 65, no. 8. — P. 830—845. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2014.12.033>.
64. Genetic Susceptibility Loci for Cardiovascular Disease and Their Impact on Atherosclerotic Plaques [Текст] / S. van der Laan [et al.] // Circulation: Genomic and Precision Medicine. — 2018. — Sept. — Vol. 11, no. 9. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGEN.118.002115>.
65. Bild, D. Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis: Objectives and Design [Текст] / D. Bild // American Journal of Epidemiology. — 2002. — 1 нояб. — Т. 156, № 9. — С. 871—881. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/aje/kwf113>.

66. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes [Текст] / R. Malik [et al.] // *Nature Genetics*. — 2018. — Mar. 12. — Vol. 50, no. 4. — P. 524—537. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41588-018-0058-3>.
67. Disproportionate Contributions of Select Genomic Compartments and Cell Types to Genetic Risk for Coronary Artery Disease [Текст] / H. Won [et al.] // *PLOS Genetics* / ed. by M. Snyder. — 2015. — Oct. 28. — Vol. 11, no. 10. — e1005622. — URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005622>.
68. Costantino, S. The Epigenome in Atherosclerosis [Текст] / S. Costantino, F. Paneni // — Springer Berlin Heidelberg, 2020. — URL: http://dx.doi.org/10.1007/164_2020_422.
69. Transcriptional and epigenetic regulation of macrophages in atherosclerosis [Текст] / T. Kuznetsova [et al.] // *Nature Reviews Cardiology*. — 2019. — Oct. 2. — Vol. 17, no. 4. — P. 216—228. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-019-0265-3>.
70. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [Текст] / G. Basatemur [et al.] // *Nature Reviews Cardiology*. — 2019. — June 26. — Vol. 16, no. 12. — P. 727—744. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9>.
71. Comparative analysis of gene expression in vascular cells of patients with advanced atherosclerosis [Текст] / M. Nazarenko [и др.] // *Biomeditsinskaya Khimiya*. — 2018. — Т. 64, № 5. — С. 416—422. — URL: <http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20186405416>.
72. Turunen, M. Epigenetics and atherosclerosis [Текст] / M. Turunen, E. Aavik, S. Ylä-Herttuala // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. — 2009. — Sept. — Vol. 1790, no. 9. — P. 886—891. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.02.008>.
73. WADDINGTON, C. Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters [Текст] / C. WADDINGTON // *Nature*. — 1959. — June. — Vol. 183, no. 4676. — P. 1654—1655. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/1831654a0>.
74. Ванюшин, Б. Эпигенетика сегодня и завтра [Текст] / Б. Ванюшин // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. — 2015. — Т. 17, № 4/2. — С. 805—832.
75. Ischemic Heart Disease and Stroke in Relation to Blood DNA Methylation [Текст] / A. Baccarelli [et al.] // *Epidemiology*. — 2010. — Nov. — Vol. 21, no. 6. — P. 819—828. — URL: <http://dx.doi.org/10.1097/EDE.0b013e3181f20457>.
76. Targeting epigenetics and non-coding RNAs in atherosclerosis: from mechanisms to therapeutics [Текст] / S. Xu [et al.] // *Pharmacology and Therapeutics*. — 2019. — Apr. — Vol. 196. — P. 15—43. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.003>.
77. Особенности метилирования CpG-сайтов в области гена микроРНК MIR10B и гена транскрипционного фактора TWIST1 при атеросклерозе [Текст] / А. Марков [и др.] // *Медицинская генетика*. — 2020. — Т. 19, № 5. — С. 44—45.

78. Анализ связи уровня метилирования генов MIR10B и MIR21 в лейкоцитах крови с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий [Текст] / Ю. А. Королева [и др.] // Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. — 2018. — Т. 33, № 2.
79. Метилирование генов микроРНК при дестабилизации атеросклеротической бляшки [Текст] / А. В. Марков [и др.]. — 2018.
80. Связь метилирования генов микроРНК со стабильностью атеросклеротической бляшки [Текст] / А. В. Марков [и др.]. — 2018.
81. Зарубин, А. Выявление кометилированных генов у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий [Текст] / А. Зарубин, А. Марков. — 2016.
82. Ross, R. Response to injury and atherogenesis. [Текст] / R. Ross, J. Glomset, L. Harker // The American journal of pathology. — 1977. — Т. 86, № 3. — С. 675.
83. Дисфункция эндотелия у пациентов с имплантируемыми сердечно-сосудистыми электронными устройствами (обзор литературы) [Текст] / Р. Калинин [и др.] // Наука молодых—Eruditio Juvenium. — 2016. — № 3.
84. Pathology of the unstable plaque [Текст] / R. Virmani [et al.] // Progress in Cardiovascular Diseases. — 2002. — Mar. — Vol. 44, no. 5. — 349—356. — URL: <http://dx.doi.org/10.1053/pcad.2002.122475>.
85. Single-Cell Genomics Reveals a Novel Cell State During Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching and Potential Therapeutic Targets for Atherosclerosis in Mouse and Human [Текст] / H. Pan [et al.] // Circulation. — 2020. — Nov. 24. — Vol. 142, no. 21. — P. 2060—2075. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048378>.
86. Atheroprotective roles of smooth muscle cell phenotypic modulation and the TCF21 disease gene as revealed by single-cell analysis [Текст] / R. Wirka [et al.] // Nature Medicine. — 2019. — July 29. — Vol. 25, no. 8. — 1280—1289. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0512-5>.
87. Decoding the transcriptome of atherosclerotic plaque at single-cell resolution [Текст] / T. Alsaigh [и др.]. — 04.03.2020. — URL: <http://dx.doi.org/10.1101/2020.03.03.968123>.
88. Atlas of the immune cell repertoire in human atherosclerotic plaques characterized by single cell RNA-sequencing and multi-color flow cytometry [Текст] / H. Horstmann [et al.] // European Heart Journal. — 2020. — Nov. 1. — Vol. 41, Supplement_2. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/ehjci/ehaa946>. 2353.
89. Gimbrone, M. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis [Текст] / M. Gimbrone, G. Garcia-Cardena // Circulation Research. — 2016. — Feb. 19. — Vol. 118, no. 4. — P. 620—636. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306301>.

90. Libby, P. Inflammation in Atherosclerosis [Текст] / P. Libby // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2012. — Sept. — Vol. 32, no. 9. — P. 2045—2051. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>.
91. Gistera, A. The immunology of atherosclerosis [Текст] / A. Gistera, G. Hansson // *Nature Reviews Nephrology*. — 2017. — Apr. 10. — Vol. 13, no. 6. — P. 368—380. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2017.51>.
92. Lineage tracing of cells involved in atherosclerosis [Текст] / J. Albarrán-Juárez [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2016. — Aug. — Vol. 251. — P. 445—453. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.06.012>.
93. Single-cell analysis of fate-mapped macrophages reveals heterogeneity, including stem-like properties, during atherosclerosis progression and regression [Текст] / J. Lin [et al.] // *JCI Insight*. — 2019. — Feb. 21. — Vol. 4, no. 4. — URL: <http://dx.doi.org/10.1172/jci.insight.124574>.
94. Transdifferentiation of Vascular Smooth Muscle Cells to Macrophage-Like Cells During Atherogenesis [Текст] / S. Feil [et al.] // *Circulation Research*. — 2014. — Sept. 12. — Vol. 115, no. 7. — P. 662—667. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304634>.
95. Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis [Текст] / S. Allahverdian [et al.] // *Circulation*. — 2014. — Apr. 15. — Vol. 129, no. 15. — P. 1551—1559. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005015>.
96. Libby, P. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis [Текст] / P. Libby, P. Ridker, G. Hansson // *Nature*. — 2011. — May. — Vol. 473, no. 7347. — P. 317—325. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10146>.
97. Subramanian, M. Dendritic cells in atherosclerosis [Текст] / M. Subramanian, I. Tabas // *Seminars in Immunopathology*. — 2013. — Nov. 6. — Vol. 36, no. 1. — P. 93—102. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-013-0400-x>.
98. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs [Текст] / R. Friedman [et al.] // *Genome Research*. — 2008. — Oct. 29. — Vol. 19, no. 1. — P. 92—105. — URL: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.082701.108>.
99. Impact of miRNA in Atherosclerosis [Текст] / Y. Lu [et al.] // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2018. — Sept. — Vol. 38, no. 9. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310227>.
100. Kozomara, A. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data [Текст] / A. Kozomara, S. Griffiths-Jones // *Nucleic Acids Research. Database*. — 2010. — Oct. 30. — Vol. 39, Database. — P. D152—D157. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq1027>.

101. Lewis, B. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets [Текст] / B. Lewis, C. Burge, D. Bartel // *Cell*. — 2005. — Jan. — Vol. 120, no. 1. — P. 15—20. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>.
102. Kucher A. N., N. M. The Role of MicroRNA in Atherogenesis [Текст] / N. M. Kucher A. N. // *Kardiologiia*. — 2017. — Т. 17, № 9. — С. 65—76. — URL: <http://dx.doi.org/10.18087/cardio.2017.9.10022>.
103. Koroleva, I. Role of microRNA in development of instability of atherosclerotic plaques [Текст] / I. Koroleva, M. Nazarenko, A. Kucher // *Biochemistry (Moscow)*. — 2017. — Nov. — Vol. 82, no. 11. — P. 1380—1390. — URL: <http://dx.doi.org/10.1134/S0006297917110165>.
104. Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis [Текст] / F. Fasolo [et al.] // *Cardiovascular Research*. — 2019. — Aug. 7. — Vol. 115, no. 12. — P. 1732—1756. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvz203>.
105. Королёва, Ю. А. Перспективы использования регуляторных РНК в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний [Текст] / Ю. А. Королёва, А. Зарубин, М. С. Назаренко. — 2018.
106. Связь экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий у человека с нестабильностью патологического процесса [Текст] / А. А. Зарубин [и др.]. — 2018.
107. Регулом микроРНК при различных фенотипах атеросклероза [Текст] / М. С. Назаренко [и др.] // *Молекулярная биология*. — 2022. — Т. 56, вып. 2. — С. 227—243.
108. HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA–disease associations [Текст] / Z. Huang [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2018. — Oct. 26. — Vol. 47, no. D1. — P. D1013—D1017. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1010>.
109. Das, S. miRwayDB: a database for experimentally validated microRNA-pathway associations in pathophysiological conditions [Текст] / S. Das, P. Saha, N. Chakravorty // *Database*. — 2018. — Jan. 1. — Vol. 2018. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/database/bay023>.
110. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology [Текст] / L. Chang [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2020. — June 2. — Vol. 48, W1. — W244—W251. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkaa467>.
111. Referenced database for experimentally supported microrna expression and atherosclerosis associations [Текст] / A. Zarubin [и др.] // *Atherosclerosis*. — 2020. — Т. 315. — e191—e192.
112. A Unique MicroRNA Signature Associated With Plaque Instability in Humans [Текст] / F. Cipollone [et al.] // *Stroke*. — 2011. — Sept. — Vol. 42, no. 9. — P. 2556—2563. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/STROKEAHA.110.597575>.

113. MicroRNA-145 Targeted Therapy Reduces Atherosclerosis [Текст] / F. Lovren [et al.] // Circulation. — 2012. — Sept. 10. — Vol. 126, 11_suppl_1. — S81—S90. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084186>.
114. MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages [Текст] / M. Nazari-Jahantigh [et al.] // Journal of Clinical Investigation. — 2012. — Oct. 8. — Vol. 122, no. 11. — P. 4190—4202. — URL: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI61716>.
115. Overexpression of microRNA-145 in atherosclerotic plaques from hypertensive patients [Текст] / D. Santovito [et al.] // Expert Opinion on Therapeutic Targets. — 2013. — Jan. 23. — Vol. 17, no. 3. — P. 217—223. — URL: <http://dx.doi.org/10.1517/14728222.2013.745512>.
116. MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway [Текст] / J. CAO [et al.] // Molecular Medicine Reports. — 2014. — Dec. 17. — Vol. 11, no. 4. — P. 2889—2895. — URL: <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2014.3107>.
117. Protective Effect of let-7 miRNA Family in Regulating Inflammation in Diabetes-Associated Atherosclerosis [Текст] / E. Brennan [et al.] // Diabetes. — 2017. — May 9. — Vol. 66, no. 8. — P. 2266—2277. — URL: <http://dx.doi.org/10.2337/db16-1405>.
118. Epigenetic factors in atherogenesis: microRNA [Текст] / A. Smirnova [и др.] // Biomeditsinskaya Khimiya. — 2016. — Т. 62, № 2. — С. 134—140. — URL: <http://dx.doi.org/10.18097/PBMC20166202134>.
119. Эпигенетика [Текст] / С. М. Закиян [и др.]. — 2012.
120. Moore, L. DNA Methylation and Its Basic Function [Текст] / L. Moore, T. Le, G. Fan // Neuropsychopharmacology. — 2012. — July 11. — Vol. 38, no. 1. — P. 23—38. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2012.112>.
121. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors [Текст] / H. Ji [et al.] // Nature. — 2010. — Aug. 15. — Vol. 467, no. 7313. — P. 338—342. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09367>.
122. Jones, P. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond [Текст] / P. Jones // Nature Reviews Genetics. — 2012. — May 29. — Vol. 13, no. 7. — P. 484—492. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3230>.
123. On the presence and role of human gene-body DNA methylation [Текст] / D. Jjingo [et al.] // Oncotarget. — 2012. — Apr. 30. — Vol. 3, no. 4. — P. 462—474. — URL: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.497>.
124. DNA Methylation Polymorphisms Precede Any Histological Sign of Atherosclerosis in Mice Lacking Apolipoprotein E [Текст] / G. Lund [et al.] // Journal of Biological Chemistry. — 2004.

- July. — Vol. 279, no. 28. — P. 29147—29154. — URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M403618200>.
125. Hiltunen, M. DNA Methylation, Smooth Muscle Cells, and Atherogenesis [Текст] / M. Hiltunen, S. Ylä-Herttuala // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2003. — Oct. — Vol. 23, no. 10. — P. 1750—1753. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000092871.30563.41>.
 126. Zhu, S. Inactivation of Monocarboxylate Transporter MCT3 by DNA Methylation in Atherosclerosis [Текст] / S. Zhu, P. Goldschmidt-Clermont, C. Dong // *Circulation*. — 2005. — Aug. 30. — Vol. 112, no. 9. — P. 1353—1361. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.519025>.
 127. Epigenetic changes in estrogen receptor α gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in vitro vascular senescence [Текст] / J. Kim [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. — 2007. — Jan. — Vol. 1772, no. 1. — P. 72—80. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.10.004>.
 128. Post, W. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system [Текст] / W. Post // *Cardiovascular Research*. — 1999. — Сент. — Т. 43, № 4. — С. 985—991. — URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00153-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00153-4).
 129. Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 gene methylation is associated with low expression in carotid atherosclerotic plaques [Текст] / C. Zawadzki [et al.] // *Atherosclerosis*. — 2009. — June. — Vol. 204, no. 2. — P. e4—e14. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.009>.
 130. miRMap: Profiling 14q32 microRNA Expression and DNA Methylation Throughout the Human Vasculature [Текст] / E. Goossens [и др.] // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. — 2019. — 8 авг. — Т. 6. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fcvm.2019.00113>.
 131. P772 The miRNA-SNP rs11077 of exportin-5 (XPO5) gene is associated with coronary artery disease risk and affects circulating miRNAs [Текст] / A. Borghini [et al.] // *European Heart Journal*. — 2018. — Aug. 1. — Vol. 39, suppl_1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/eurheartj/ehy564.P772>.
 132. microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity [Текст] / J. Króliczewski [et al.] // *Gene*. — 2018. — Jan. — Vol. 640. — P. 66—72. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.021>.
 133. Calore, M. Genetics meets epigenetics: Genetic variants that modulate noncoding RNA in cardiovascular diseases [Текст] / M. Calore, L. De Windt, A. Rampazzo // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. — 2015. — Dec. — Vol. 89. — P. 27—34. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.028>.

134. An update of miRNASNP database for better SNP selection by GWAS data, miRNA expression and online tools [Текст] / J. Gong [et al.] // Database. — 2015. — Jan. 1. — Vol. 2015. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/database/bav029>.
135. SNPs in microRNA target sites and their potential role in human disease [Текст] / A. Moszyńska [et al.] // Open Biology. — 2017. — Apr. — Vol. 7, no. 4. — P. 170019. — URL: <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.170019>.
136. Genetic Variants in MicroRNAs Predict Recurrence of Ischemic Stroke [Текст] / Z. Zhang [et al.] // Molecular Neurobiology. — 2016. — Mar. 24. — Vol. 54, no. 4. — P. 2776—2780. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s12035016-9865-7>.
137. Polymorphisms of miRNAs genes are associated with the risk and prognosis of coronary artery disease [Текст] / H. Zhi [et al.] // Clinical Research in Cardiology. — 2011. — Dec. 11. — Vol. 101, no. 4. — P. 289—296. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00392-011-0391-3>.
138. Association of microRNA Polymorphisms with the Risk of Myocardial Infarction in a Chinese Population [Текст] / C. Chen [et al.] // The Tohoku Journal of Experimental Medicine. — 2014. — Vol. 233, no. 2. — P. 89—94. — URL: <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.233.89>.
139. Association of the genetic polymorphisms in immunoinflammatory microRNAs with risk of ischemic stroke and subtypes in an Iranian population [Текст] / H. Darabi [et al.] // Journal of Cellular Physiology. — 2018. — Sept. 19. — Vol. 234, no. 4. — P. 3874—3886. — URL: <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.27159>.
140. Genetic Polymorphisms in Pre-microRNAs and Risk of Ischemic Stroke in a Chinese Population [Текст] / Y. Liu [et al.] // Journal of Molecular Neuroscience. — 2013. — Nov. 1. — Vol. 52, no. 4. — P. 473—480. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-013-0152-z>.
141. Potential Impact of MicroRNA-423 Gene Variability in Coronary Artery Disease [Текст] / C. Jha [et al.] // Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets. — 2019. — Jan. 3. — Vol. 19, no. 1. — P. 67—74. — URL: <http://dx.doi.org/10.2174/1871530318666181005095724>.
142. The association between pre-miR-27a rs895819 polymorphism and myocardial infarction risk in a Chinese Han population [Текст] / M. Cai [et al.] // Lipids in Health and Disease. — 2018. — Jan. 6. — Vol. 17, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s12944-017-0652-x>.
143. Association Between Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) in miR-146a, miR-196a2, and miR-499 and Risk of Ischemic Stroke: A Meta-Analysis [Текст] / J. Zhu [et al.] // Medical Science Monitor. — 2015. — Nov. 26. — Vol. 21. — P. 3658—3663. — URL: <http://dx.doi.org/10.12659/msm.895233>.
144. Association of miR-146a rs2910164 polymorphism with cardio-cerebrovascular diseases: A systematic review and meta-analysis [Текст] / Y. He [et al.] // Gene. — 2015. —

- July. — Vol. 565, no. 2. — P. 171—179. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.020>.
145. A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression [Текст] / X. Xiong [et al.] // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. — 2014. — Mar. — Vol. 761. — P. 15—20. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2014.01.001>.
 146. Meta-Analysis of miR-146a Polymorphisms Association with Coronary Artery Diseases and Ischemic Stroke [Текст] / M. Bao [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2015. — June 24. — Vol. 16, no. 12. — 14305—14317. — URL: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms160714305>.
 147. An rs13293512 polymorphism in the promoter of let-7 is associated with a reduced risk of ischemic stroke [Текст] / L. Zhang [et al.] // Journal of Thrombosis and Thrombolysis. — 2016. — Aug. 16. — Vol. 42, no. 4. — P. 610—615. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11239-016-1400-1>.
 148. miRNA Polymorphisms and Risk of Cardio-Cerebrovascular Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis [Текст] / M. Bastami [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. — 2019. — Jan. 12. — Vol. 20, no. 2. — P. 293. — URL: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20020293>.
 149. Associations between miR-146a rs2910164 polymorphisms and risk of ischemic cardio-cerebrovascular diseases [Текст] / D. Zhao [et al.] // Medicine. — 2019. — Oct. — Vol. 98, no. 42. — e17106. — URL: <http://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000017106>.
 150. A micro RNA-146a polymorphism is associated with coronary restenosis [Текст] / L. Hamann [et al.] // International Journal of Immunogenetics. — 2014. — July 22. — Vol. 41, no. 5. — P. 393—396. — URL: <http://dx.doi.org/10.1111/iji.12136>.
 151. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma [Текст] / K. Jazdzewski [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. — 2008. — May 12. — Vol. 105, no. 20. — P. 7269—7274. — URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0802682105>.
 152. A polymorphism rs3746444 within the pre-miR-499 alters the maturation of miR-499-5p and its antiapoptotic function [Текст] / W. Ding [et al.] // Journal of Cellular and Molecular Medicine. — 2018. — Aug. 13. — Vol. 22, no. 11. — P. 5418—5428. — URL: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.13813>.
 153. Human exome sequence data in support of somatic mosaicism in carotid atherosclerosis [Текст] / A. A. Sleptcov [и др.] // Data in Brief. — 2021. — Июнь. — Т. 39. — С. 107656. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dib.2021.107656>.

154. The rs2910164 G>C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant melanoma [Текст] / J. Yamashita [et al.] // *Melanoma Research*. — 2013. — Feb. — Vol. 23, no. 1. — P. 13—20. — URL: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e32835c5b30>.
155. miRTarBase 2020: updates to the experimentally validated microRNA–target interaction database [Текст] / H. Huang [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — Oct. 24. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz896>.
156. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans [Текст] / F. L. Karczewski Konrad J. [et al.] // *Nature*. — 2020. — May 27. — Vol. 581, no. 7809. — P. 434—443. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7>.
157. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update [Текст] / T. Barrett [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2012. — Nov. 26. — Vol. 41, no. D1. — P. D991—D995. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks1193>.
158. Ayari, H. Identification of two genes potentially associated in iron-heme homeostasis in human carotid plaque using microarray analysis [Текст] / H. Ayari, G. Bricca // *Journal of Biosciences*. — 2013. — Mar. 15. — Vol. 38, no. 2. — 311—315. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s12038-013-9310-2>.
159. Andrés-León, E. Erratum: Corrigendum: miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis [Текст] / E. Andrés-León, R. Núñez-Torres, A. Rojas // *Scientific Reports*. — 2018. — Jan. 8. — Vol. 8, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/srep46928>.
160. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [Текст] / M. Martin // *EMBnet.journal*. — 2011. — 2 мая. — Т. 17, № 1. — С. 10. — URL: <http://dx.doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
161. Robinson, M. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [Текст] / M. Robinson, D. McCarthy, G. Smyth // *Bioinformatics*. — 2009. — Nov. 11. — Vol. 26, no. 1. — 139—140. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
162. Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays [Текст] / M. Aryee [et al.] // *Bioinformatics*. — 2014. — Jan. 28. — Vol. 30, no. 10. — P. 1363—1369. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049>.
163. GATK hard filtering: tunable parameters to improve variant calling for next generation sequencing targeted gene panel data [Текст] / S. De Summa [et al.] // *BMC Bioinformatics*. — 2017. — Mar. — Vol. 18, S5. — URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-017-1537-8>.
164. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs [Текст] / Y. Liao [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2019. — May 22. — Vol. 47, W1. — W199—W205. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz401>.

165. TAM 2.0: tool for MicroRNA set analysis [Текст] / J. Li [et al.] // Nucleic Acids Research. — 2018. — June 6. — Vol. 46, W1. — W180—W185. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky509>.
166. Smyth, G. limma: Linear Models for Microarray Data [Текст] / G. Smyth // — Springer-Verlag. — С. 397—420. — URL: http://dx.doi.org/10.1007/0-387-29362-0_23.
167. Suzuki, R. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering [Текст] / R. Suzuki, H. Shimodaira // Bioinformatics. — 2006. — Apr. 4. — Vol. 22, no. 12. — P. 1540—1542. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btl117>.
168. Kassambara, A. Package ‘factoextra’ [Текст] / A. Kassambara, F. Mundt // Extract and visualize the results of multivariate data analyses. — 2017. — Т. 76.
169. Langfelder, P. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis [Текст] / P. Langfelder, S. Horvath // BMC Bioinformatics. — 2008. — Dec. — Vol. 9, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-9-559>.
170. Gong, T. DeconRNASeq: a statistical framework for deconvolution of heterogeneous tissue samples based on mRNA-Seq data [Текст] / T. Gong, J. Szustakowski // Bioinformatics. — 2013. — Feb. 21. — Vol. 29, no. 8. — 1083—1085. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btt090>.
171. Teschendorff, A. E. EpiDISH-Epigenetic Dissection of Intra-Sample Heterogeneity-R package [Текст] / A. E. Teschendorff, S. C. Zheng. — 2020
172. Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ. MULTISNPR [Текст] / Н. Марков, А. В. Зарубин, А. А. ; Ф. государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». — № 2021615202 ; заявл. 30.12.2020 ; опубл. 18.01.2021, 2021610680 (Рос. Федерация).
173. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [Текст] / H. Wickham. — Springer-Verlag New York, 2016. — URL: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
174. Induced osteogenic differentiation of human smooth muscle cells as a model of vascular calcification [Текст] / W. Pustlausk [et al.] // Scientific Reports. — 2020. — Apr. 6. — Vol. 10, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-62568-w>.
175. Деконволюция клеточного состава тканей на основе данных секвенирования микроРНК [Текст] / А. Зарубин [и др.] // Медицинская генетика. — 2020. — Т. 19, № 12. — С. 64—65.
176. A Change in Inflammatory Footprint Precedes Plaque Instability: A Systematic Evaluation of Cellular Aspects of the Adaptive Immune Response in Human Atherosclerosis [Текст] / R. van Dijk [et al.] // Journal of the American Heart Association. — 2015. — Apr. 22. — Vol. 4, no. 4. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.114.001403>.

177. Artery Tertiary Lymphoid Organs: Powerhouses of Atherosclerosis Immunity [Текст] / C. Yin [и др.] // *Frontiers in Immunology*. — 2016. — 10 окт. — Т. 7. — URL: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00387>.
178. Проблема клеточной гетерогенности при анализе метилирования ДНК в образцах пораженных атеросклерозом артерий: биоинформатический подход [Текст] / А. Марков [и др.] // *Комплексные проблемы сердечнососудистых заболеваний*. — 2019. — Т. 8, S3—2. — С. 37—37.
179. Оценка уровня лейкоцитарной инфильтрации в атеросклеротической бляшке на основании данных о метилировании ДНК [Текст] / А. А. Зарубин [и др.]. — 2018.
180. МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И КЛЕТОЧНАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ В АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКИХ БЛЯШКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ У ЧЕЛОВЕКА [Текст] / А. Марков [и др.] // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. — 2019. — С. 992—992.
181. Клеточная гетерогенность при анализе метилирования ДНК в пораженных атеросклерозом артериях [Текст] / А. В. Марков [и др.] // *Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики*. — 2019. — С. 39—40.
182. Cell-type deconvolution from DNA methylation in carotid atherosclerotic plaques using bioinformatics approach [Текст] / A. Markov [и др.] // *Systems Biology and Bioinformatics (SBB-2019)*. — 2019. — С. 32—32.
183. Identifying cell subtypes in the carotid atherosclerotic plaques by the deconvolution MiRNA analysis [Текст] / A. Zarubin [и др.] // *BIOINFORMATICS OF GENOME REGULATION AND STRUCTURE/ SYSTEMS BIOLOGY (BGRS/SB-2020)*. — 2020. — С. 560—560.
184. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis [Текст] / C. Du [et al.] // *Nature Immunology*. — 2009. — Oct. 18. — Vol. 10, no. 12. — P. 1252—1259. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1798>.
185. Increased expression of microRNA miR-326 in type 1 diabetic patients with ongoing islet autoimmunity [Текст] / G. Sebastiani [et al.] // *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. — 2011. — Nov. — Vol. 27, no. 8. — P. 862—866. — URL: <http://dx.doi.org/10.1002/dmrr.1262>.
186. Negative Correlation Between miR-326 and Ets-1 in Regulatory T Cells from new-Onset SLE Patients [Текст] / X. Sun [et al.] // *Inflammation*. — 2016. — Feb. 9. — Vol. 39, no. 2. — P. 822—829. — URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10753-016-0312-8>.
187. Taleb, S. IL-17 and Th17 cells in atherosclerosis: subtle and contextual roles [Текст] / S. Taleb, A. Tedgui, Z. Mallat // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. — 2015. — Т. 35, № 2. — С. 258—264.

188. Circulating microRNAs as potential biomarkers for coronary plaque rupture [Текст] / S. Li [et al.] // *Oncotarget*. — 2017. — May 30. — Vol. 8, no. 29. — P. 48145—48156. — URL: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.18308>.
189. МикроРНК miR-326: согласованность изменений метилирования ДНК и экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий [Текст] / А. А. Зарубин [и др.] // *Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики*. — 2019. — С. 25—27.
190. МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНА МИКРОРНК MIR127 В КЛЕТКАХ СОННЫХ АРТЕРИЙ И КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ [Текст] / Т. Дампилова [и др.] // VI Международная конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. — 2019. — С. 466—470.
191. DNA methylation profiling within microRNA genes in atherosclerotic plaque destabilization [Текст] / A. Markov [и др.] // *Atherosclerosis*. — 2018. — Т. 275. — e188—e189.
192. OxLDL up-regulates microRNA-29b, leading to epigenetic modifications of MMP-2/MMP-9 genes: a novel mechanism for cardiovascular diseases [Текст] / K. Chen [et al.] // *The FASEB Journal*. — 2011. — Jan. 25. — Vol. 25, no. 5. — P. 1718—1728. — URL: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10174904>.
193. Oxidized low-density lipoprotein is a common risk factor for cardiovascular diseases and gastroenterological cancers via epigenomical regulation of microRNA-210 [Текст] / K. Chen [et al.] // *Oncotarget*. — 2015. — June 3. — Vol. 6, no. 27. — P. 24105—24118. — URL: <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.4152>.
194. Bouchareychas, L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: from lipoprotein metabolism to MicroRNA control of inflammation [Текст] / L. Bouchareychas, R. L. Raffai // *Journal of cardiovascular development and disease*. — 2018. — Т. 5, № 2. — С. 30.
195. Apolipoprotein E enhances microRNA-146a in monocytes and macrophages to suppress nuclear factor- κ B-driven inflammation and atherosclerosis [Текст] / K. Li [и др.] // *Circulation research*. — 2015. — Т. 117, № 1. — e1—e11.
196. Convergent Multi-miRNA Targeting of ApoE Drives LRP1/LRP8-Dependent Melanoma Metastasis and Angiogenesis [Текст] / N. Pencheva [et al.] // *Cell*. — 2012. — Nov. — Vol. 151, no. 5. — P. 1068—1082. — URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.028>.
197. Le, N. MicroRNA 199a and the eNOS (Endothelial NO Synthase)/NO Pathway [Текст] / N. Le, J. Abe // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. — 2018. — Oct. — Vol. 38, no. 10. — P. 2278—2280. — URL: <http://dx.doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311515>.

198. Systemic Approach to Identify Serum microRNAs as Potential Biomarkers for Acute Myocardial Infarction [Текст] / A. Hsu [et al.] // BioMed Research International. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1—13. — URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/418628>.
199. Свидетельство о гос. регистрации программы для ЭВМ. AdapMiR [Текст] / Н. Зарубин, А. А. Марков, А. В. ; Ф. государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук». — № 2021615202 ; заявл. 22.03.2021 ; опубл. 05.04.2021, 2021615202 (Рос. Федерация).
200. MicroRNA-186-5p serves as a diagnostic biomarker in atherosclerosis and regulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration [Текст] / B. Sun [и др.] // Cellular & Molecular Biology Letters. — 2020. — Дек. — Т. 25, вып. 1. — С. 27.
201. Zhang, S. E2F1/ SNHG7/ miR-186-5p/ MMP2 axis modulates the proliferation and migration of vascular endothelial cell in atherosclerosis [Текст] / S. Zhang, X. Zhu, G. Li // Life Sciences. — 2020. — Сент. — Т. 257. — С. 118013.
202. Associations between genetic variations in microRNA and myocardial infarction susceptibility: a meta-analysis and systematic review [Текст] / Y. Yang [и др.] // Herz. — 2021. — Дек.
203. Association between polymorphisms in microRNAs and ischemic stroke in an Asian population: evidence based on 6,083 cases and 7,248 controls [Текст] / D. Zou [и др.] // Clinical Interventions in Aging. — 2018. — Сент. — Т. Volume 13. — С. 1709—1726.
204. miR-149 and miR-499 gene polymorphism and the incident of ischemic stroke in the Asian population: From a case-control study to meta-analysis [Текст] / R. Zhu [и др.] // Clinical Neurology and Neurosurgery. — 2020. — Июнь. — Т. 193. — С. 105789.
205. LncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation [Текст] / Z.-m. Ye [и др.] // Cell Death & Disease. — 2019. — Февр. — Т. 10, вып. 2. — С. 138.
206. Carotid Intima-Media Thickness, Genetic Risk, and Ischemic Stroke: A Family-Based Study in Rural China [Текст] // International Journal of Environmental Research and Public Health. — 2020. — Дек. — Т. 18, вып. 1. — С. 119.
207. MicroRNA-146a-5p alleviates lipopolysaccharide-induced NLRP3 inflammasome injury and pro-inflammatory cytokine production via the regulation of TRAF6 and IRAK1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [Текст] / J. Hou [и др.] // Annals of Translational Medicine. — 2021. — Сент. — Т. 9, вып. 18. — С. 1433—1433.
208. The Pathogenic Role of Long Non-coding RNA H19 in Atherosclerosis via the miR-146a-5p/ANGPTL4 Pathway [Текст] // Frontiers in Cardiovascular Medicine. — 2021. — Нояб. — Т. 8.

209. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4 [Текст] / S.-B. Qin [и др.] // *Journal of Cellular Physiology*. — 2018. — Окт. — Т. 233, вып. 10. — С. 6630—6637.
210. miR-27a-3p Targets ATF3 to Reduce Calcium Deposition in Vascular Smooth Muscle Cells [Текст] / N. Choe [и др.] // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. — 2020. — Дек. — Т. 22. — С. 627—639.
211. microRNA-363-3p reduces endothelial cell inflammatory responses in coronary heart disease via inactivation of the NOX4-dependent p38 MAPK axis [Текст] / T. Zhou [и др.] // *Aging*. — 2021. — Апр. — Т. 13, вып. 8. — С. 11061—11082.
212. Targetome profiling and functional genetics implicate miR-618 in lymphomagenesis [Текст] / A. Fu [и др.] // *Epigenetics*. — 2014. — Май. — Т. 9, вып. 5. — С. 730—737.
213. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. [Текст] / Feinberg M. W., Moore K. J. // *Circulation research*. — 2016. — Февр. — Т. 118, вып. 4. — С. 703—20.
214. miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease. [Текст] / P. Ramkaran [и др.] // *Cell biochemistry and biophysics*. — 2014. — Март. — Т. 68, вып. 2. — С. 259—66.
215. Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. [Текст] / Y. Takahashi [и др.] // *Clinical science (London, England : 1979)*. — 2010. — Июль. — Т. 119, вып. 9. — С. 395—405.
216. Маннанова, К. Полиморфизм генов микроРНК в атеросклеротических бляшках [Текст] / К. Маннанова, А. Зарубин. — 2020.
217. The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes [Текст] / B. Alipoor [и др.] // *Journal of Endocrinological Investigation*. — 2018. — Май. — Т. 41, вып. 5. — С. 557—566.
218. MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques [Текст] / M. Parahuleva [et al.] // *Scientific Reports*. — 2018. — May 18. — Vol. 8, no. 1. — URL: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-01825690-4>.
219. Johnson, J. The predictive potential of circulating microRNA for future cardiovascular events [Текст] / J. Johnson // *Cardiovascular Research*. — 2020. — May 18. — Vol. 117, no. 1. — P. 1—3. — URL: <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvaa145>.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- CpG-сайт – (от англ. cytosine – guanine site) – 5'-цитозин-фосфат-гуанин-3 сайт
- EWAS – (англ. epigenome-wide association study) – эпигеномные исследования ассоциации
- FDR – (англ. false discovery rate) – ожидаемая доля ложных отклонений
- GWAS – (англ. genome-wide association study) – широкогеномные исследования ассоциаций
- miRNA-seq – (англ. microRNA sequencing) – микроРНК секвенирования
- scRNAseq – (англ. single-cell transcriptomics) – транскриптомика одиночных клеток
- SNPs – (англ. single nucleotide polymorphisms) – однонуклеотидный полиморфизм
- Th1– Т-хелперы 1 типа
- WGCNA – (англ. weighted gene coexpression network analysis) – анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов
- БСА – атеросклеротические бляшки сонных артерий
- ГМК – гладкомышечные клетки
- ИБС – ишемическая болезнь сердца
- ИИ – ишемический инсульт
- ИСА – относительно интактная часть сонных артерий
- КБ – килобаз
- ЛП – липопротеины
- МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография
- МФ – макрофаги
- НФ – нейтрофилы
- ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
- СД2 – сахарный диабет 2 типа
- СРМ – (от англ. Count Per Million) – количество прочтений на миллион
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ТИА – транзиторные ишемические атаки
- ФБ – фибробласты
- ЭК – эндотелиальные клетки

ПРИЛОЖЕНИЕ А

**Дифференциально-экспрессированные микроРНК между атеросклеротическими
бляшками и подлежащими интактными частями сонных артерий**

микроРНК	Уровень экспрессии (CPM)					HMDD
	log2FC	p-value	FDR	БСА M(Q25, Q75)	ИСА M(Q25, Q75)	
hsa-let-7c-5p	-2.348	0.00000	0.00000	627 (509,666)	3542 (2146,4885)	1
hsa-let-7e-3p	1.007	0.00577	0.01626	41 (23,47)	15 (15,22)	1
hsa-let-7i-5p	-1.237	0.00074	0.00296	13160 (10577,23945)	37625 (35286,40798)	0
hsa-miR-1-3p	1.005	0.01297	0.03171	2088 (1654,3197)	1014 (803,1484)	0
hsa-miR-106a-5p	-3.014	0.00000	0.00002	11 (10,18)	70 (49,92)	0
hsa-miR-106b-5p	-1.811	0.00000	0.00001	165 (136,170)	626 (318,939)	1
hsa-miR-10a-3p	-1.513	0.00435	0.01299	16 (9,17)	43 (37,49)	7
hsa-miR-10b-3p	-3.227	0.00000	0.00000	3 (2,6)	47 (29,54)	2
hsa-miR-10b-5p	-2.950	0.00000	0.00000	1076 (643,1165)	10303 (5902,11099)	2
hsa-miR-1249-3p	2.107	0.00000	0.00001	8 (8,9)	2 (1,3)	0
hsa-miR-125a-5p	1.240	0.00653	0.01768	6030 (3133,6982)	1780 (1472,2890)	1
hsa-miR-125b-2-3p	-1.963	0.00004	0.00021	34 (22,35)	144 (73,151)	2
hsa-miR-126-3p	-3.018	0.00000	0.00000	4495 (3316,6472)	44138 (42169,51175)	33
hsa-miR-126-5p	-3.055	0.00000	0.00000	95 (86,130)	1435 (1195,1466)	33
hsa-miR-1260b	1.035	0.00067	0.00276	11 (10,12)	5 (5,6)	0
hsa-miR-1296-5p	1.335	0.00083	0.00326	67 (30,69)	19 (15,25)	0
hsa-miR-1301-3p	1.117	0.00027	0.00118	44 (41,47)	23 (16,24)	0
hsa-miR-1307-3p	1.556	0.00001	0.00005	166 (161,186)	62 (48,69)	0
hsa-miR-130b-5p	2.029	0.00000	0.00000	18 (17,20)	4 (3,7)	0
hsa-miR-133a-3p	2.253	0.00001	0.00010	540 (250,567)	137 (84,140)	3
hsa-miR-133a-5p	2.093	0.00027	0.00118	13 (10,18)	3 (3,4)	3
hsa-miR-133b	2.269	0.00005	0.00025	32 (19,37)	7 (5,8)	1
hsa-miR-134-5p	-1.051	0.00199	0.00669	49 (46,55)	95 (81,111)	2
hsa-miR-136-5p	-1.377	0.01637	0.03792	5 (4,16)	29 (10,34)	1
hsa-miR-137-3p	1.849	0.00356	0.01098	11 (9,12)	2 (1,11)	0
hsa-miR-138-5p	-2.453	0.00009	0.00046	1 (1,2)	6 (2,12)	0
hsa-miR-139-3p	-2.165	0.00003	0.00021	5 (3,7)	21 (15,21)	0
hsa-miR-139-5p	-1.808	0.00000	0.00002	106 (98,115)	406 (328,436)	0
hsa-miR-140-3p	1.485	0.00003	0.00021	25596 (15990,27478)	9048 (7790,10140)	0
hsa-miR-143-3p	1.226	0.00183	0.00631	227530 (210975,348751)	98946 (77244,115813)	5
hsa-miR-144-3p	-4.050	0.00000	0.00000	32 (16,100)	644 (615,1237)	1
hsa-miR-144-5p	-3.930	0.00000	0.00000	48 (29,152)	763 (696,1274)	1
hsa-miR-145-5p	2.888	0.00000	0.00000	23302 (12576,36199)	3074 (2370,5158)	16
hsa-miR-146a-5p	1.289	0.00010	0.00048	5445 (4529,7884)	2756 (2130,2873)	16
hsa-miR-148a-3p	-1.451	0.00322	0.01021	4630 (3198,9572)	15615 (12563,16011)	0
hsa-miR-149-5p	1.030	0.00741	0.01947	33 (29,58)	18 (18,20)	0
hsa-miR-154-5p	-1.280	0.00003	0.00021	8 (7,8)	22 (16,24)	0
hsa-miR-155-5p	1.324	0.00010	0.00049	960 (865,1312)	418 (344,449)	24
hsa-miR-15b-3p	-2.005	0.00000	0.00000	15 (13,17)	70 (46,73)	0
hsa-miR-15b-5p	-1.176	0.00205	0.00680	256 (256,262)	531 (354,568)	0
hsa-miR-16-2-3p	-1.767	0.00001	0.00007	37 (36,39)	151 (98,173)	1
hsa-miR-16-5p	-1.413	0.00006	0.00031	1400 (1281,1685)	3560 (3013,4606)	1
hsa-miR-17-5p	-1.013	0.00359	0.01099	709 (609,733)	1143 (1093,1559)	6

Продолжение Приложения А Таблицы 19

hsa-miR-181a-3p	1.255	0.00075	0.00296	115 (80,166)	56 (51,62)	3
hsa-miR-181c-3p	1.497	0.00000	0.00001	46 (42,46)	15 (14,19)	0
hsa-miR-181d-5p	1.148	0.00052	0.00217	77 (54,81)	30 (28,32)	0
hsa-miR-182-5p	-3.827	0.00000	0.00000	41 (26,50)	362 (324,778)	3
hsa-miR-183-5p	-3.547	0.00000	0.00000	17 (15,21)	129 (116,311)	0
hsa-miR-185-5p	-1.332	0.00628	0.01752	551 (508,737)	1261 (880,1309)	1
hsa-miR-18a-5p	-1.857	0.00000	0.00000	17 (7,19)	53 (32,68)	0
hsa-miR-190a-5p	-1.310	0.00547	0.01578	4 (3,5)	6 (6,34)	0
hsa-miR-192-5p	-1.541	0.00004	0.00024	122 (100,126)	362 (195,424)	0
hsa-miR-193a-5p	1.086	0.00761	0.01984	169 (147,296)	78 (63,128)	0
hsa-miR-194-5p	-1.700	0.00011	0.00050	97 (83,106)	316 (173,383)	0
hsa-miR-196b-5p	-1.462	0.00725	0.01919	4 (2,4)	10 (5,12)	0
hsa-miR-197-3p	1.366	0.00000	0.00002	270 (256,277)	91 (88,105)	0
hsa-miR-199b-5p	-3.233	0.00000	0.00000	946 (577,1105)	12593 (11877,13128)	0
hsa-miR-19a-3p	-1.609	0.00001	0.00005	45 (27,85)	157 (115,227)	2
hsa-miR-19b-3p	-1.334	0.00002	0.00013	394 (223,442)	909 (613,1257)	3
hsa-miR-20a-5p	-1.195	0.00025	0.00113	1437 (871,1534)	2554 (2158,4336)	3
hsa-miR-20b-5p	-2.964	0.00000	0.00001	23 (18,32)	141 (105,218)	0
hsa-miR-210-3p	2.688	0.00000	0.00000	934 (837,1029)	105 (84,172)	7
hsa-miR-210-5p	4.469	0.00000	0.00000	9 (4,10)	0 (0,0)	7
hsa-miR-217-5p	2.314	0.00024	0.00110	111 (109,133)	28 (13,29)	0
hsa-miR-218-1-3p	-2.098	0.00000	0.00002	1 (1,2)	6 (5,9)	0
hsa-miR-218-5p	-2.596	0.00000	0.00003	136 (105,378)	1095 (1068,2020)	0
hsa-miR-222-3p	1.009	0.00632	0.01752	805 (510,979)	366 (316,416)	13
hsa-miR-223-3p	-1.268	0.00068	0.00276	231 (193,253)	521 (389,581)	3
hsa-miR-223-5p	-1.691	0.00149	0.00526	13 (11,25)	44 (33,48)	3
hsa-miR-23b-3p	1.227	0.00091	0.00352	8947 (7474,15934)	4536 (4034,4814)	2
hsa-miR-23b-5p	1.232	0.00052	0.00216	20 (18,30)	9 (9,11)	2
hsa-miR-25-3p	-1.216	0.00126	0.00456	883 (694,1066)	1876 (1493,2206)	0
hsa-miR-28-3p	1.516	0.00000	0.00004	1501 (1348,1573)	605 (484,654)	0
hsa-miR-29b-2-5p	1.076	0.00677	0.01804	56 (30,59)	18 (17,30)	4
hsa-miR-3085-3p	3.112	0.00000	0.00000	10 (10,12)	1 (0,1)	0
hsa-miR-30c-2-3p	1.014	0.00038	0.00163	55 (54,64)	27 (25,35)	1
hsa-miR-31-5p	1.190	0.01897	0.04309	26 (18,41)	7 (6,19)	2
hsa-miR-3158-3p	-2.154	0.00002	0.00012	4 (3,5)	17 (8,27)	0
hsa-miR-32-5p	-1.779	0.01601	0.03731	17 (7,33)	111 (54,127)	0
hsa-miR-326	1.171	0.00103	0.00388	42 (39,47)	21 (15,23)	0
hsa-miR-328-3p	1.619	0.00001	0.00007	227 (177,248)	62 (55,72)	1
hsa-miR-331-3p	1.585	0.00005	0.00025	109 (61,113)	31 (23,36)	0
hsa-miR-335-3p	-2.667	0.00000	0.00000	11 (9,14)	50 (45,53)	0
hsa-miR-335-5p	-3.313	0.00000	0.00000	15 (14,20)	100 (71,162)	0
hsa-miR-338-3p	-2.808	0.00000	0.00000	3 (2,5)	21 (15,30)	0
hsa-miR-338-5p	-2.171	0.00000	0.00000	10 (7,10)	39 (29,46)	0
hsa-miR-339-5p	1.457	0.00002	0.00013	231 (190,238)	71 (63,78)	0
hsa-miR-340-3p	1.044	0.01057	0.02658	34 (24,51)	17 (17,20)	0
hsa-miR-342-3p	1.319	0.00000	0.00002	795 (771,822)	311 (311,338)	1
hsa-miR-34a-3p	1.085	0.00186	0.00637	11 (9,14)	6 (3,7)	6
hsa-miR-3605-3p	1.684	0.00005	0.00025	12 (7,13)	3 (3,4)	0
hsa-miR-363-3p	-3.084	0.00002	0.00014	80 (43,87)	769 (228,808)	0
hsa-miR-376a-3p	-1.549	0.00109	0.00407	8 (8,10)	17 (13,24)	0
hsa-miR-376c-3p	-1.164	0.00415	0.01247	15 (15,19)	28 (26,33)	0
hsa-miR-377-3p	-1.535	0.00017	0.00077	3 (3,6)	9 (8,13)	0
hsa-miR-379-5p	-1.244	0.00177	0.00617	79 (75,132)	215 (180,287)	0

Продолжение Приложения А Таблицы 19

hsa-miR-3909	1.190	0.00019	0.00087	12 (11,13)	6 (4,6)	0
hsa-miR-411-5p	-1.120	0.00648	0.01768	69 (66,131)	163 (154,239)	0
hsa-miR-423-3p	1.385	0.00005	0.00025	1651 (1043,1674)	525 (456,563)	0
hsa-miR-451a	-3.893	0.00000	0.00000	5626 (3152,5862)	99103 (36169,115930)	0
hsa-miR-452-3p	-1.454	0.00003	0.00021	4 (3,5)	10 (8,13)	0
hsa-miR-452-5p	-1.440	0.00001	0.00007	46 (44,69)	128 (119,162)	0
hsa-miR-455-3p	1.573	0.00000	0.00001	208 (166,210)	60 (57,61)	0
hsa-miR-484	1.148	0.00145	0.00514	322 (246,369)	134 (115,196)	0
hsa-miR-485-3p	1.234	0.00865	0.02192	7 (6,10)	3 (2,4)	0
hsa-miR-486-3p	-2.657	0.00009	0.00045	3 (2,3)	10 (7,15)	0
hsa-miR-486-5p	-2.677	0.00011	0.00050	697 (369,947)	3610 (1960,4174)	0
hsa-miR-5010-3p	1.379	0.00001	0.00008	18 (16,21)	8 (7,8)	0
hsa-miR-504-5p	1.643	0.00009	0.00045	174 (136,221)	50 (45,50)	0
hsa-miR-543	1.667	0.00001	0.00006	36 (20,39)	9 (6,14)	0
hsa-miR-5683	-4.722	0.00000	0.00000	0 (0,0)	4 (2,17)	0
hsa-miR-582-5p	-1.590	0.00004	0.00024	4 (4,5)	16 (12,17)	0
hsa-miR-584-5p	-2.529	0.00000	0.00001	4 (3,5)	24 (17,26)	0
hsa-miR-618	-1.255	0.00283	0.00913	3 (3,3)	8 (5,9)	0
hsa-miR-624-5p	-2.071	0.00002	0.00012	2 (1,2)	9 (5,11)	0
hsa-miR-655-3p	-1.120	0.00647	0.01768	6 (6,8)	12 (11,18)	0
hsa-miR-664a-3p	1.189	0.00006	0.00031	94 (93,98)	42 (37,47)	0
hsa-miR-671-3p	1.644	0.00000	0.00001	13 (12,13)	5 (4,5)	0
hsa-miR-7-5p	-1.475	0.00443	0.01311	204 (124,398)	627 (590,983)	1
hsa-miR-95-3p	-1.524	0.00001	0.00008	126 (118,130)	385 (383,427)	0
hsa-miR-96-5p	-3.446	0.00000	0.00000	9 (4,11)	56 (40,103)	0
hsa-miR-98-5p	-1.059	0.00244	0.00795	601 (464,691)	1281 (1122,1347)	3
hsa-miR-99a-3p	-1.898	0.00000	0.00004	15 (11,17)	61 (36,63)	1
hsa-miR-99a-5p	-2.459	0.00000	0.00001	3501 (3027,5530)	27233 (15062,32096)	1
hsa-miR-99b-5p	1.196	0.00008	0.00043	4208 (3731,5562)	2230 (1727,2348)	1

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Референсный набор данных по экспрессии микроРНК клеточных линий

Имя образца	Тип клеток	Пол	Возраст	Компания	Номер лота
FF:11361-117I2	ГМК брахицефального ствола			Cell Applications	2366
FF:11433-118H2	ГМК брахицефального ствола			Cell Applications	1851
FF:11288-117A1	ГМК лёгочной артерии	М	45	Cell Applications	1217
FF:11365-117I6	ГМК лёгочной артерии	Ж	41	Cell Applications	1346
FF:11210-116A4	ГМК аорты	М	54	Cell Applications	
FF:11283-116I5	ГМК аорты	М	39	Cell Applications	1401(1)
FF:11360-117I1	ГМК аорты	М	40	Cell Applications	1347
FF:11285-116I7	ГМК из каротидных артерий			Cell Applications	2435
FF:11362-117I3	ГМК из каротидных артерий			Cell Applications	1655
FF:11245-116E3	Фибробласты аорты	Ж	68	Lonza	
FF:11326-117E3	Фибробласты аорты	М	65	Lonza	
FF:11401-118D6	Фибробласты аорты	Ж	19	Lonza	
FF:11207-116A1	Эндотелиальные клетки артерий			Cell Applications	
FF:11263-116G3	Эндотелиальные клетки артерий	Ж	28	Cell Applications	1151
FF:11340-117F8	Эндотелиальные клетки артерий	Ж	56	Cell Applications	1508
FF:11412-118E8	Эндотелиальные клетки артерий	М	21	Cell Applications	1487
FF:11264-116G4	Эндотелиальные клетки артерий	Ж	51	Cell Applications	1851
FF:11341-117F9	Эндотелиальные клетки артерий	М	26	Cell Applications	2463
FF:11413-118E9	Эндотелиальные клетки артерий	М	53	Cell Applications	1596
FF:11266-116G6	Эндотелиальные клетки артерий	Ж	34	Cell Applications	1696
FF:11343-117G2	Эндотелиальные клетки артерий	М	50	Cell Applications	1555
FF:11232-116C8	макрофаги	М	65	3HBiomedical	Mac722
FF:11313-117C8	макрофаги	М	46	3HBiomedical	Mac723
FF:11389-118C3	макрофаги	Ж	57	3HBiomedical	Mac724
FF:11544-120B5	В клетки			3HBiomedical	
FF:11624-122B4	В клетки			3HBiomedical	
FF:11705-123B4	В клетки			3HBiomedical	
4534-67I8	В клетки				
FF:11226-116C2	CD8+, Т клетки	М	47	3HBiomedical	CD8T725
FF:11307-117C2	CD8+, Т клетки	М	57	3HBiomedical	CD8T726
FF:11383-118B6	CD8+, Т клетки	М	53	3HBiomedical	CD8T727
FF:11225-116C1	CD4+, Т клетки	М	53	3HBiomedical	CD4T727
FF:11306-117C1	CD4+, Т клетки	М	57	3HBiomedical	CD4T726
FF:11382-118B5	CD4+, Т клетки	Ж	26	3HBiomedical	CD4T734
FF:11230-116C6	NK-клетки	М	47	3HBiomedical	NK725
FF:11311-117C6	NK-клетки	М	57	3HBiomedical	NK726
FF:11387-118C1	NK-клетки	М	53	3HBiomedical	NK727
FF:11233-116C9	Нейтрофилы	М	66	3HBiomedical	Neu734
FF:11314-117C9	Нейтрофилы	М	38	3HBiomedical	Neu735
FF:11390-118C4	Нейтрофилы	Ж	29	3HBiomedical	Neu736

ПРИЛОЖЕНИЕ В

**Дифференциально-экспрессированные микроРНК между атеросклеротическими
бляшками сонных артерий с высокой и низкой лейкоцитарной инфильтрацией**

микроРНК	Уровень экспрессии (CPM)					HMDD
	log2FC	p-value	FDR	БСА M(Q25, Q75)	ИСА M(Q25, Q75)	
hsa-let-7c-5p	-1.488	0.00037	0.01179	593 (579,973)	329 (218,342)	1
hsa-miR-1-3p	-2.093	0.00301	0.03310	7587 (3784,9068)	1648 (419,2428)	0
hsa-miR-100-5p	-1.207	0.00524	0.04139	69332 (64406,107221)	40859 (30594,51328)	3
hsa-miR-10393-3p	2.216	0.00211	0.02671	1 (1,2)	5 (3,10)	0
hsa-miR-10395-3p	1.450	0.00157	0.02295	194 (172,235)	488 (409,646)	0
hsa-miR-10395-5p	1.813	0.00072	0.01615	2 (1,2)	8 (5,9)	0
hsa-miR-106b-3p	1.518	0.00431	0.03583	215 (179,353)	320 (293,1017)	1
hsa-miR-125b-2-3p	-1.308	0.00234	0.02800	81 (61,93)	28 (24,37)	2
hsa-miR-1301-3p	1.444	0.00044	0.01230	17 (16,19)	44 (42,52)	0
hsa-miR-1307-3p	1.328	0.00157	0.02295	98 (82,118)	224 (196,257)	0
hsa-miR-144-5p	2.273	0.00401	0.03583	5 (3,10)	22 (9,71)	1
hsa-miR-146b-3p	1.412	0.00095	0.01823	36 (23,41)	91 (80,109)	2
hsa-miR-147b-3p	2.343	0.00003	0.00236	4 (3,4)	13 (9,23)	0
hsa-miR-182-5p	2.289	0.00125	0.02061	34 (18,48)	38 (30,184)	3
hsa-miR-183-5p	2.581	0.00021	0.00871	15 (13,18)	27 (21,88)	0
hsa-miR-185-3p	1.416	0.00140	0.02215	24 (21,25)	47 (46,87)	1
hsa-miR-195-3p	-1.610	0.00306	0.03310	117 (54,145)	32 (17,42)	0
hsa-miR-199a-3p	-1.509	0.00319	0.03360	13941 (12302,17276)	6113 (3297,7749)	0
hsa-miR-199a-5p	-1.391	0.00349	0.03544	8280 (7253,8491)	2927 (1789,4114)	0
hsa-miR-199b-3p	-1.487	0.00388	0.03583	6977 (6078,8650)	2865 (1713,3962)	0
hsa-miR-210-3p	1.768	0.00049	0.01235	153 (125,276)	484 (403,761)	7
hsa-miR-215-5p	-1.698	0.00032	0.01090	20 (18,28)	9 (3,9)	0
hsa-miR-23b-3p	-1.327	0.00424	0.03583	4044 (3672,5737)	2263 (1302,2658)	2
hsa-miR-27b-3p	-1.506	0.00236	0.02800	52964 (43014,58152)	23359 (8943,25652)	4
hsa-miR-30a-3p	-2.190	0.00003	0.00236	831 (427,1006)	174 (130,215)	1
hsa-miR-30a-5p	-1.397	0.00652	0.04846	14936 (13288,23664)	8481 (4248,10227)	1
hsa-miR-30b-5p	-1.768	0.00204	0.02671	384 (280,1096)	219 (182,244)	1
hsa-miR-30c-2-3p	-1.543	0.00444	0.03583	59 (48,84)	33 (11,37)	1
hsa-miR-326	2.832	0.00000	0.00048	10 (8,13)	50 (42,56)	0
hsa-miR-345-5p	1.370	0.00028	0.01063	22 (15,23)	53 (45,58)	0
hsa-miR-3615	1.655	0.00355	0.03544	27 (23,40)	48 (44,104)	0
hsa-miR-378a-3p	1.275	0.00649	0.04846	953 (841,1369)	2460 (2164,3052)	0
hsa-miR-378a-5p	1.608	0.00062	0.01475	6 (4,7)	16 (13,20)	0
hsa-miR-378c	2.035	0.00019	0.00871	21 (17,25)	49 (45,54)	0
hsa-miR-378d	2.142	0.00115	0.01986	6 (5,9)	20 (9,21)	0
hsa-miR-382-3p	-1.834	0.00176	0.02468	24 (18,66)	12 (8,18)	1
hsa-miR-424-3p	1.575	0.00646	0.04846	3 (2,6)	10 (8,19)	0
hsa-miR-425-5p	2.522	0.00002	0.00236	43 (40,45)	115 (73,200)	0
hsa-miR-451a	3.043	0.00002	0.00236	2138 (1077,4001)	8288 (7813,24509)	0
hsa-miR-486-3p	2.561	0.00211	0.02671	4 (2,6)	7 (5,30)	0
hsa-miR-486-5p	3.691	0.00007	0.00448	891 (356,1549)	2757 (1292,9751)	0
hsa-miR-504-5p	-1.594	0.00045	0.01230	70 (46,81)	24 (14,28)	0
hsa-miR-584-5p	2.198	0.00089	0.01823	8 (5,11)	13 (10,50)	0

Продолжение Приложения В Таблицы 21

hsa-miR-652-3p	1.775	0.00014	0.00766	105 (84,159)	282 (218,491)	0
hsa-miR-664b-5p	1.998	0.00430	0.03583	2 (1,5)	11 (7,26)	0
hsa-miR-766-3p	2.546	0.00101	0.01823	1 (0,2)	6 (2,14)	0
hsa-miR-9-3p	-1.998	0.00383	0.03583	11 (5,24)	3 (1,5)	2
hsa-miR-9-5p	-2.007	0.00287	0.03292	532 (136,1332)	171 (107,210)	2
hsa-miR-92a-1-5p	2.392	0.00377	0.03583	0 (0,1)	2 (0,5)	3
hsa-miR-941	1.582	0.00101	0.01823	39 (35,59)	123 (92,175)	0
hsa-miR-99a-5p	-1.100	0.00438	0.03583	2740 (2644,4055)	1472 (1344,1631)	1

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю – д.м.н., Назаренко М.С. за ценные советы и профессиональную помощь, которая была оказана при проведении данного диссертационного исследования, советы и помощь при планировании эксперимента и безграничное терпение в процессе оформления текста диссертации. Отдельно хотелось бы поблагодарить к.м.н. Маркова А.В. и Шарыш Д.В. за помощь в проведении экспериментальной работы, обсуждении результатов.

Автор выражает признательность д.м.н., профессору Барбараш О.Л. и коллективу Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», а также д.м.н. Козлову Б. Н. и к.м.н. Кузнецову М. С. и сотрудникам отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии Томского НИМЦ за помощь в обследовании пациентов и сборе биологического материала для формирования биобанка.

Автор благодарит сотрудника отделения общей и молекулярной патологии НИИ онкологии Томского НИМЦ к.м.н. Крахмаль Н.В., за проведение гистологического анализа образцов.

Автор выражает благодарность коллективу лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ за участие в обсуждении результатов, помощь в планировании и проведении исследования.

Автор выражает слова искренней благодарности всем сотрудникам института за участие в обсуждении результатов диссертационной работы на заседаниях ученого совета и в личной беседе.