

На правах рукописи



ЗАРУБИН АЛЕКСЕЙ АНДРЕЕВИЧ

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

1.5.7 – генетика

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте медицинской генетики, г. Томск.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук,
Назаренко Мария Сергеевна

Официальные оппоненты:

Чурносов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», заведующий кафедрой медико-биологических дисциплин Медицинского института (г. Белгород)

Шахтшнейдер Елена Владимировна, кандидат медицинских наук, Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний (г. Новосибирск)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», г. Москва.

Защита состоится «___» _____ 202__ года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <https://www.tnimc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Хитринская И.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Атеросклероз – широко распространенное, социально значимое заболевание, осложнения которого являются ведущей причиной смертности и инвалидизации в мире [Song P. et al., 2020; ВОЗ., 2020; Росстат., 2020]. 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 [Herrington W. et al., 2016; Libby P. et al., 2019].

Атерогенез является динамичным и комплексным патологическим процессом, в основе которого лежит большое количество различных причин [Pasterkamp G. et al., 2016]. Факторы риска атеросклероза и его осложнения имеют существенную генетическую компоненту: их наследуемость варьирует от 20 до 90% [Khera A. Kathiresan S., 2017; Forgo B. et al., 2018; Дзизинский А.А., Пузырев В.П., 1977]. Однако анализ ассоциаций однонуклеотидного полиморфизма (SNP) отдельных генов кандидатов и широкогеномные исследования ассоциаций (GWAS) позволяют выявить генетическую компоненту факторов риска атеросклероза, но не проясняют 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 [Dichgans M. et al., 2014; Nikpay M. et al., 2015; Malik R. et al., 2016; Kovacic J., 2017; Zeng L. et al., 2019].

Поскольку далеко не все случаи развития атеросклероза удается объяснить известными на настоящий момент генетическими факторами, в последнее время большое внимание уделяется изучению эпигенетических механизмов регуляции активности генов в различных клетках, в том числе и в органах-мишенях при патологии [Ambrosini S. et al., 2020]. 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 [Siemeling M. et al., 2018; Agha G. et al., 2019; Sharma A. et al., 2020; Mens M. et al., 2021; Nazarenko M. S. et al., 2022].

Атеросклеротические бляшки артерий на поздней стадии патологического процесса хорошо гистологически охарактеризованы [Stary H. et al., 1995; Шахтшнейдер Е.В. и др., 2021]. Однако существуют сложности использования гистологической классификации в отношении атеросклеротических бляшек, которые имеют высокий риск нестабильности. Кроме того, атеросклеротические бляшки сонных артерий, полученные при оперативном вмешательстве, часто имеют измененную морфологию. Можно предположить, что профили метилирования ДНК и экспрессии микроРНК будут информативны для молекулярной классификации образцов атеросклеротических бляшек.

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 [de Rie D. et al., 2017]. В свою очередь микроРНК способны изменять уровень метилирования ДНК, регулируя ДНК-метилтрансферазу или метил-ДНК связывающие белки [Wang S. et al., 2017]. Показано, что метилирование ДНК в области генов микроРНК выше по сравнению с белок-кодирующими генами [Weber V. et al., 2007]. Более того, в некоторых регионах хромосом, обогащенных CpG-сайтами, а также в CpG-«островках» содержится большое число микроРНК [Morales S. et al., 2017].

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, ранее не проводились. Поскольку данные механизмы могут взаимно дополнять друг друга, обеспечивая функционирование обратной связи, это представляется актуальным для исследования, что позволит обнаружить новые механизмы развития атеросклероза, в том числе определит ключевые терапевтические молекулярные мишени, обеспечивая основу для прецизионной медицины. С другой стороны, эпигенетические модификации могут являться биомаркерами для прогноза и диагностики осложненного течения атеросклеротического поражения артерий.

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 [Raitoharju E. et al., 2013; Maitrias P. et al., 2017; Sharma A. et al., 2020]. В исследованиях, посвящённых изучению экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий, чаще всего используется кандидатный подход [Королёва Ю., Назаренко М., Кучер А., 2018] или микрочиповые технологии [Raitoharju E. et al., 2011; Denecke B. et al., 2012; Markus B. et al., 2016].

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 объединения результатов, полученных с использованием различных платформ. Технология miRNA-seq свободна от таких недостатков, но на данный момент этот подход не применялся для исследования ткани самой атеросклеротической бляшки.

Внимание исследователей при обследовании пациентов с атеросклеротическим поражением артерий различной локализации, главным образом, уделяется анализу метилирования ДНК в области промоторов белок-кодирующих генов и только в нескольких работах отмечается изменение уровня метилирования ДНК в области генов микроРНК [Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2014; Nazarenko M. et al., 2015; Wang H. et al., 2019; Назаренко М.С. и др., 2011; Назаренко М.С. и др., 2013; Марков А.В., Назаренко М.С., 2014]. Результаты исследований, связанных с изучением метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек, плохо согласуются друг с другом. 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.

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 С 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 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.

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

Апробация материалов диссертации. Основные результаты работы докладывались на конгрессах Европейского общества атеросклероза (European Atherosclerosis Society Congress, EAS) в 2018-2022 гг., международной мультikonференции «Биоинформатика Геномной Регуляции и Структурной/Системной Биологии», (BGRS/SB) в 2018 г. и 2020 г., Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» 2018 г. и 2021 г., Всероссийском конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» в 2018 г., 2020 г., и 2022 г., 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..

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.

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.

Структура и объем 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.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн диссертационного исследования представлен на рисунке 1. Проведение работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (№9 от 26.11.2018 г.). Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Медицинская геномика» Томского НИМЦ и ресурсов биоколлекции «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. 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 (СД2). Всем пациентам по показаниям (>65% стеноза каротидных артерий) проведена каротидная эндартерэктомия. Степень стеноза сонной артерии у пациентов по данным ультразвукового исследования (УЗИ) составила 90 [80,95]%.

Контрольная группа включала 72 относительно здоровых индивидов в отношении сердечно-сосудистой патологии. Их медианный 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 индивидов из данной группы были в пределах нормы основные биохимические показатели, которые относятся к факторам риска ССЗ (общий холестерин, триглицериды, ЛПВП, ЛПНП, глюкоза).

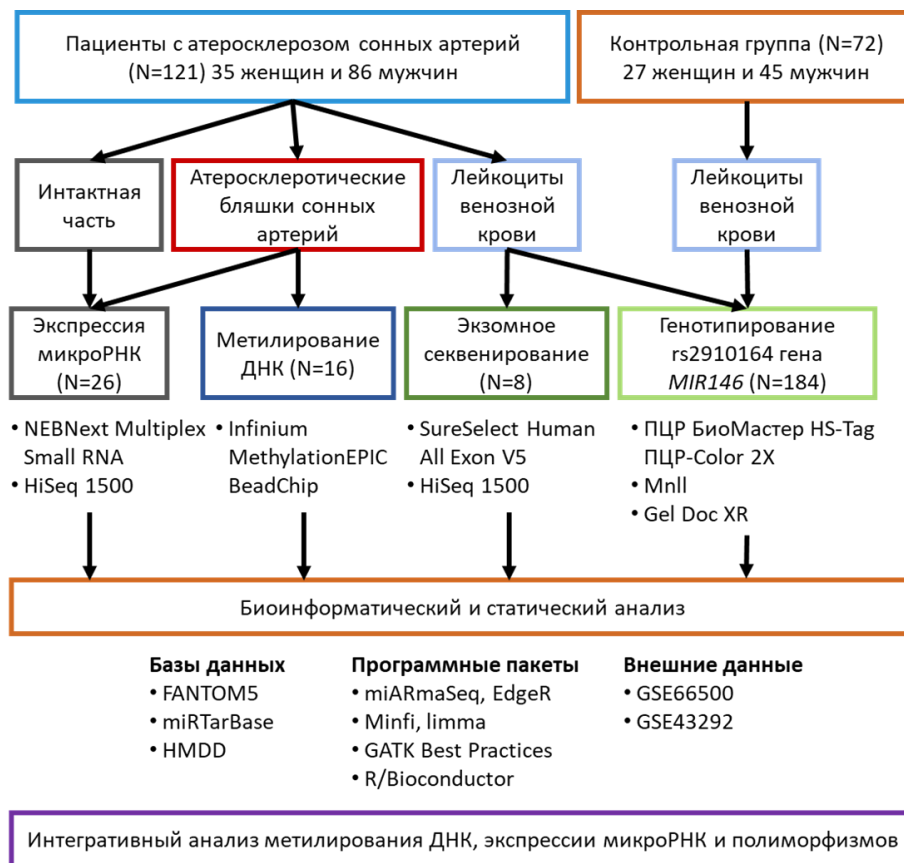


Рисунок 1 – Дизайн диссертационного исследования.

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

У пациентов в ходе проведения плановой каротидной эндартэромии были получены биоптаты поражённой атеросклерозом сонной артерии (БСА, n=21) и подлежащая относительно интактная часть ткани (ИСА, n=5). Артерии после оперативного вмешательства фрагментировались на равнопредставленные части. Одна часть использовалась для выделения нуклеиновых кислот, другая – для гистологического исследования. Поражённые атеросклерозом сонные артерии были окрашены гематоксилин-эозином с последующим анализом стадии патологического процесса, согласно классификации American Heart Association (АНА) [Stary H. et al., 1995]. Согласно результатам гистологического анализа, атеросклеротические бляшки сонных артерий относились ко II типу (n=1), III типу (n=3), IV типу (n=8), V (n=2) и VI типам (n=7).

Молекулярно-генетические методы. Экспрессия малых некодирующих РНК оценена в 26 образцах (5 парных образцов получены от одних и тех же пациентов из БСА и ИСА, а 16 образцов – из БСА) 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).

Оценка уровня метилирования ДНК выполнена с помощью микрочипов Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) в 16 образцах БСА, для которых был также измерен уровень микроРНК.

Анализ генетических вариантов в области генов микроРНК проведен с помощью экзомного секвенирования образцов ДНК лейкоцитов периферической крови, полученных от 8 пациентов с атеросклерозом сонных артерий. Для приготовления ДНК-библиотек использовали набор SureSelect Human All Exon V5 (Agilent) с последующим секвенированием на приборе HiSeq 1500 (Illumina). Первичные данные хранятся в репозитории NCBI BioProject, PRJNA758796 [Sleptcov A.A. et al., 2021].

Анализ полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* проведен в 184 образцах (112 пациентов и 72 здоровых индивидов) с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [Yamashita J. и др., 2013].

Биоинформатическая обработка данных. Обработка данных секвенирования микроРНК выполнена с помощью набора программ miARma-Seq [Andrés-León E. et al., 2018]. Адаптеры обрезались программой cutadapt [Martin M., 2011]. Выравнивание последовательностей проводили на сборку генома человека GRCh38 (hg38) с использованием алгоритма Bowtie1. Покрытие микроРНК рассчитывали в соответствии с miRbase v. 22 [Kozomara A. et al., 2010]. 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 [Robinson M. et al., 2009]. Функциональная аннотация результатов секвенирования микроРНК проводилась с использованием веб-инструментов WebGestalt [Liao Y. et al., 2019] и TAM2 [Li J. et al., 2018].

Биоинформатическая обработка данных метилирования ДНК проведена в программной среде R с использованием пакетов minfi [Aryee M. et al., 2014]. 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 килобаз в области генов микроРНК.

Биоинформатическая обработка данных экзомного секвенирования выполнена согласно алгоритму GATK Best Practices [De Summa S. et al., 2017] для анализа однонуклеотидных полиморфизмов, а также небольших инсерций и делеций.

Предикция функциональной значимости SNPs в отношении экспрессии микроРНК выполнена с помощью программы miRVaS.

Интегративный и статистический анализ выполнен в программной среде R и пакете limma [Smyth G., 2005]. Кластерный анализ сделан с использованием пакета pvclust [Suzuki R. et al., 2006], а снижение размерности данных - в пакете factoextra, для этого применялся метод главных координат [Kassambara A. et al., 2017]. Поиск модулей коэкспрессии микроРНК проводился с использованием пакета WGCNA (анализ взвешенных сетей коэкспрессии генов) [Langfelder P. et al., 2008]. Деконволюция клеточного состава была реализована с использованием пакета DeconRNASeq [Gong T. et al., 2013] для данных микроРНК и с использованием пакета EpiDISH [Teschendorff A.E. et al., 2020] для данных метилирования ДНК. Визуализация проводилась с использованием пакета ggplot2 [Wickham H., 2016].

Для проведения анализа также привлечены различные внешние источники и общедоступные базы, в том числе FANTOM5 [de Rie D. et al., 2017], miRTarBase [Huang H. et al., 2019], HMDD [Huang Z. et al., 2018], miRNet [Das S., Saha P., Chakravorty N., 2018], miRwayDB [Chang L. et al., 2020], gnomAD [Karczewski Konrad J. F. L. et al., 2020]. Из базы данных GEO (в том числе с использованием инструмента GEO2R) [Barrett T. et al., 2012] получены первичные данные двух микрочиповых экспериментов GSE66500 [Zaina S. et al., 2015] и GSE43292 [Ayari H., Bricca G., 2013].

Для сравнительного анализа отдельных групповых различий применялись точный критерий Фишера и критерий χ^2 в зависимости от размера выборки. Расчёт данных критериев проведён с использованием программы MULTISNPR [Марков А.В. и др., 2020]. Множественное тестирование статистических гипотез выполнено с поправкой Бенджамини-Хохберга и статистически значимыми считались результаты при достигнутом уровне значимости $FDR < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии микроРНК в сонных артериях. Для оценки профиля экспрессии микроРНК в БСА и ИСА использованы парные образцы от 5 пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Всего в образцах артерий обнаружено 352 микроРНК (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 ИСА и 46% в БСА от всех экспрессирующихся микроРНК соответственно.

По уровню экспрессии микроРНК образцы БСА хорошо дистанцируются от ИСА, как в пространстве PCA, так и при иерархической кластеризации. Данный результат, скорее всего, объясняется существующей тканевой специфичностью экспрессии микроРНК.

Выявлено 125 дифференциально-экспрессирующихся микроРНК между БСА и ИСА. Из них 54 (44%) микроРНК имели повышенную экспрессию в БСА, а 71 (56%) микроРНК — пониженную. Функциональная аннотация показала, что данные

дифференциально-экспрессированные микроРНК связаны с патологиями сердечно-сосудистой системы и мышц; с факторами транскрипции, регулирующими развитие миоцитов (MYOG, MYOD, MYF5, MRF4, CALCINEURIN), а также со злокачественными новообразованиями (лейкоз, хондрома, карциномы) и транскрипционными факторами клеточного цикла, пролиферации и апоптоза (TP73, TNFSF12, SMAD4).

Дифференциальная экспрессия микроРНК между БСА и ИСА связана с транскрипционными факторами – ERS1 и E2F1. Эстрогены считаются протективным фактором в отношении риска развития атеросклероза. По-видимому, существует взаимосвязь между широким спектром микроРНК и ESR1 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 зарегистрированы в атеросклеротической бляшке.

Третья группа патологий, с которой была выявлена ассоциация дифференциально-экспрессированных микроРНК между БСА и ИСА – инфекционно-воспалительные заболевания (воспаление раны, сепсис, инфекция микобактерией туберкулеза), что может отражать влияние микроРНК на воспалительный процесс, протекающий в атеросклеротической бляшке. Среди обнаруженных функциональных категорий присутствовали макрофаги, моноциты и путь передачи Toll-подобных рецепторов.

Для 107 из выявленных в исследовании дифференциально-экспрессированных микроРНК между БСА и ИСА в базе данных miRTarBase определен хотя бы один ген-мишень, имеющий высокий уровень экспериментальной доказательности, а всего это было 1371 гена. Функциональная аннотация генов-мишеней по базам GO, KEGG, Reactome, Disgenet, DrugBank выявила, что те гены, которые регулировались микроРНК, демонстрирующими разнонаправленное изменение экспрессии, вовлечены в максимальное количество биологических процессов и заболеваний – 2216 категорий, в том числе пролиферация ГМК и эндотелиальных клеток (ЭК), атеросклероз, СД2, воспаление, ишемия головного мозга.

Для оценки клеточного состава артерий был разработан алгоритм деконволюции на основании экспрессии микроРНК, включающий подготовку референсной панели экспрессии микроРНК клеточных линий из проекта FANTOM5 и пакет DeconRNASeq [Gong T., Szustakowski J., 2013], адаптированный для работы с экспрессией микроРНК [Зарубин А.А. и др., 2020]. В результате выявлено, что ИСА содержат существенную долю ГМК и фибробластов (37-52%), нейтрофилов (31-35%) и В-клеток (17-30%), а эндотелиальные клетки (0-0.1%), Т- и НК-клеточный компонент (0.1-1%) представлены минорно (Рисунок 2). Атеросклеротические бляшки характеризуются более высокой долей Т- и НК-клеток (4-12%) и меньшим процентом В-клеток (5-16%). Макрофагальный компонент (1-5%) обнаруживается только в БСА. Это согласуется с данными литературы о перераспределении иммунных клеток между слоями артерий при атеросклерозе, что является критическим фактором прогрессии патологического процесса и развития осложнений.

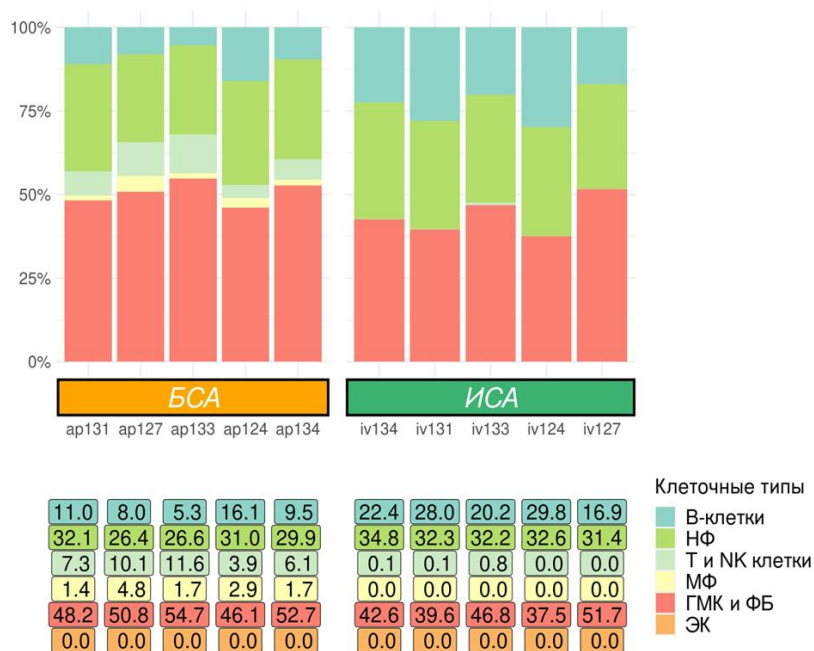


Рисунок 2 – Относительные доли клеток, рассчитанные на основании профилей экспрессии микроРНК в БСА и ИСА.

Коэкспрессионный анализ микроРНК в сонных артериях 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 $p=0.001$). Функциональная аннотация коэкспрессируемых микроРНК показала их ассоциацию с отдельными сердечно-сосудистыми и иммунно-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, ГМК 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 иммунно-воспалительными и онкологическими заболеваниями, а также поликистозом почек и дифференцировкой нервных стволовых клеток.

Оценка профиля метилирования ДНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Для оценки профиля метилирования ДНК в БСА использованы образцы, полученные от 16 пациентов с атеросклерозом (возраст 51-74 лет), из них 10 (63%) были мужчинами. Гистологически БСА принадлежали к II-VI типам. У каждого пациента из группы было не менее одного из традиционных факторов риска ССЗ, в том числе СД2 отмечен у 4 человек.

По уровню метилирования ДНК атеросклеротические бляшки сонных артерий разделялись на две группы. 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.

Используя данные об уровне метилирования ДНК, был рассчитан клеточный состав БСА с помощью биоинформатического алгоритма EpiDISH и разработанного референса CpG-сайтов, индекс метилирования которых специфичен для клеток артерии. В результате установлено, что расчетная доля иммунных клеток в БСА варьирует от 24% до 86% и полностью объясняет их разделение на две группы – с высокой (ВЛИ) и низкой лейкоцитарной инфильтрацией (НЛИ; Рисунок 3).

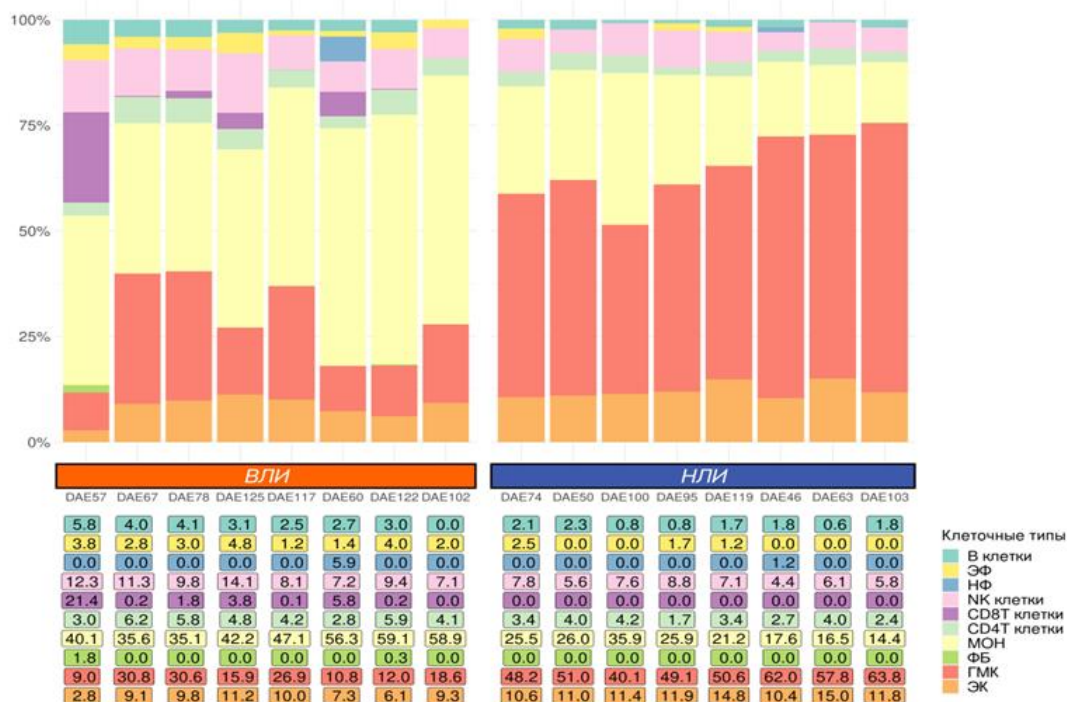


Рисунок 3 – Относительные доли клеток, рассчитанные на основании профилей метилирования ДНК в БСА.

Следует отметить, что DAE57 (гистологически верифицированный рестеноз) сильно отличается по своему клеточному составу от других образцов: большей долей иммунных клеток (особенно CD8-Т-клеток), меньшей – ГМК и ЭК, а также наличием фибробластов (Рисунок 3). У пациента DAE60, который перенес 2 инсульта в бассейне средней мозговой артерии в анамнезе (за 6 лет и 4 месяца до операции), в БСА регистрировалась большая доля нейтрофилов (Рисунок 3).

При сравнении двух групп БСА с ВЛИ и НЛИ по уровню метилирования 795729 CpG-сайтов, обнаружено 42643 дифференциально-метилированных CpG-сайтов ($\Delta\text{-Beta} > 0.20$ и $\text{FDR} < 0.05$), из них 10 CpG-сайтов непосредственно располагались в генах микроРНК. Семь CpG-сайтов характеризовались увеличением уровня метилирования в группе ВЛИ по сравнению с НЛИ (cg25214966 (miR-199a-2), cg09951047 (miR-3074; miR-24-1), cg22576612 (miR-4319), cg10259889 (miR-4285), cg01942816 (miR-589), cg02875879 (miR-302a), cg10432569 (miR-196a-1)), а три CpG-сайта, наоборот, снижением уровня метилирования (cg01966791 (miR-1914), cg11375638 (miR-4524a/b) и cg07018107 (miR-1208)).

Во внешних данных – БСА от пациентов с/без ОНМК в анамнезе (n=38, GSE66500), наблюдалась схожая картина кластеризации – две крупные группы, расчетная доля иммунных клеток варьировала от 9% до 78%. Таким образом, паттерн метилирования ДНК в БСА ассоциирован с их клеточным составом.

Связь метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Для установления связи экспрессии микроРНК с метилированием ДНК проведено исследование 14 образцов БСА (это были те же артерии, в которых проведен анализ уровня метилирования ДНК).

Анализ главных компонент и оценка вклада клеточных компонент в уровень экспрессии микроРНК показал разделение БСА на две группы – с ВЛИ и НЛИ, схожим образом с метилированием ДНК (Рисунок 4). Первая группа – ВЛИ, содержала образцы с высокой долей макрофагов >5% или общего лейкоцитарного компонента >48%. Во второй группе – НЛИ, макрофаги практически отсутствовали <1%, а доля ГМК и фибробластов была >50%.

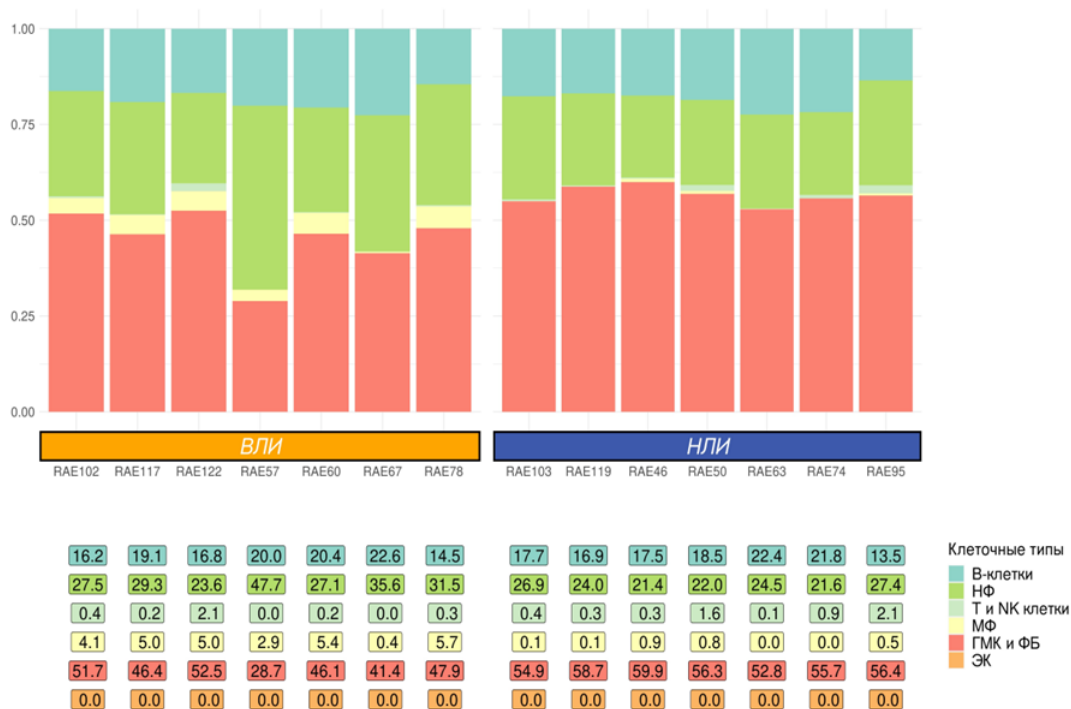


Рисунок 4 – Относительные доли клеток, рассчитанные на основании профилей экспрессии микроРНК в БСА.

Выявлена 51 дифференциально-экспрессированная микроРНК между ВЛИ и НЛИ, из них 20 (39%) микроРНК имели сниженную экспрессию в ВЛИ, а 31 (61%) - повышенную. При этом 18 микроРНК были также дифференциально-экспрессированы между БСА и ИСА. Наиболее значимые различия по уровню экспрессии и вариабельности микроРНК между группами ВЛИ и НЛИ, а также БСА и ИСА обнаружены для miR-326 ($\log_2FC=2.83$ и $\log_2FC=1.17$; $FDR<0.05$). Уровень miR-326 коррелировал с метилированием двух CpG-сайтов, расположенных вблизи гена *MIR326* (cg08960830, [$Rho=-0.78$, $p=0.002$]; cg25899829 [$Rho=-0.76$, $p=0.002$]; Рисунок 5). Данные CpG-сайты входят в регуляторные области для гена микроРНК. Согласно базе данных FANTOM5, miR-326 имеет максимальный уровень экспрессии

в клетках моноцитарного ростка, в частности в макрофагах. Известно, что miR-326 участвует в Т-клеточном ответе и регулирует синтез IL-17 в лейкоцитах при аутоиммунных заболеваниях, однако механизм ее связи с атеросклерозом неизвестен.

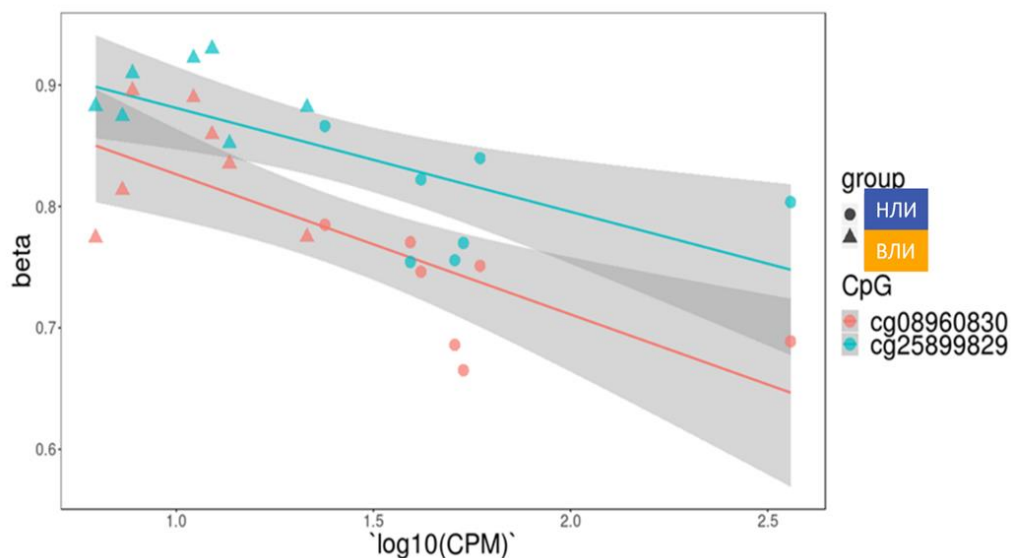


Рисунок 5 – Корреляция уровня miR-326 с уровнем метилирования CpG-сайтов cg08960830 и cg25899829; Примечание: beta - уровень метилирования ДНК, CPM - количество прочтений на миллион.

В образцах БСА выявлены 13 микроРНК, мишенями которых являются ДНК-метилтрансферазы (DNMT1, DNMT3A), а также метил CpG-связывающий белок 2 (MECP2). Из них miR-143-3p, miR-148a-3p, miR-126-3p и miR-155-5p имеют высокий уровень экспрессии в образцах сонных артерий ($\log_2\text{CPM} > 8$). DNMT1 регулируется двумя микроРНК (miR-126-3p и miR-148a-3p), показывающими согласованное уменьшение уровня экспрессии в БСА относительно ИСА ($\log_2\text{FC} = -3.02$, $\text{FDR} < 0.05$; $\log_2\text{FC} = -1.45$, $\text{FDR} < 0.05$), а DNMT3A только одной мажорной miR-143-3p, которая увеличивает свой уровень экспрессии в БСА ($\log_2\text{FC} = 1.22$, $\text{FDR} < 0.05$), MECP2, в свою очередь, регулируется miR-155-5p, также увеличивающей свой уровень экспрессии в БСА ($\log_2\text{FC} = 1.32$, $\text{FDR} < 0.05$).

Анализ дифференциальной экспрессии генов *DNMT1*, *DNMT3A* и *MECP2* в БСА по сравнению ИСА во внешних данных ($n=64$, GSE43292), показал увеличение экспрессии гена *DNMT1* в БСА ($\log_2\text{FC} = 0.38$, $\text{FDR} < 0.05$). Экспрессия гена *MECP2*, наоборот, была снижена в БСА ($\log_2\text{FC} = -0.16$, $\text{FDR} < 0.05$), а для *DNMT3A* не удалось установить значимых различий изменения экспрессии между БСА и ИСА.

Идентификация полиморфизма в структуре зрелой микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. В данном разделе работы использовалась выборка из 8 пациентов с атеросклерозом сонных артерий. Это были те же пациенты-мужчины, у которых проведен анализ экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в БСА.

Для поиска связи выявленных полиморфизмов с атеросклерозом нами были сопоставлены данные о SNPs, полученные по результатам секвенирования микроРНК из БСА и экзомного секвенирования лейкоцитов крови. В результате обнаружено 24

SNPs, локализованных в 18 генах микроРНК, которые являются кандидатами для анализа с точки зрения их функциональной значимости на регуляцию экспрессии соответствующих микроРНК в БСА. Из них 14 (58%) вариантов были частыми в популяции (MAF gnomAD >5%). 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*).

При анализе связи 24 SNPs с уровнем экспрессии 19 микроРНК в БСА выявлено, что экспрессия miR-618 была в 27 раз выше в БСА у пациентов с генотипом CC rs2682818 гена *MIR618* по сравнению с генотипом AC ($\log_2FC=4.8$; $p=0.012$). 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 А rs2682818 приводит к снижению уровня зрелой miR-618 по сравнению с аллелем С в клетках HeLa [Fu A. et al., 2014]. Кроме того показано, что генотипы AC/AA rs2682818 выступают в роли негативного прогностического фактора рецидива ИИ [Zhang Z. et al., 2016].

Из всех микроРНК, высоко экспрессирующихся в БСА, наиболее хорошо изученной является miR-146a. Данная микроРНК ингибирует передачу сигналов через NFkB в эндотелиальных клетках и в макрофагах путем интерференции с TRAF6 и IRAK1/2, тем самым снижая экспрессию провоспалительных цитокинов [Hamann L. et al., 2014; Ramkaran P. et al., 2014; Feinberg M. et al., 2016; Hou J. et al., 2021]. Полиморфизм rs2910164 приводит к замене нуклеотидов G>C в последовательности пре-микроРНК гена *MIR146A* и далее «пассажирской цепи» зрелой miR-146a-3p, что нарушает процессинг и конформацию вторичной структуры pre-miR-146a и ее стабильность. Однако все работы по анализу ассоциации данного полиморфизма с клиническими осложнениями атеросклероза проведены в популяциях Азии.

В рамках настоящего исследования проведено генотипирование rs2910164 гена *MIR146A* лейкоцитов крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий (n=112) и относительно здоровых славян-жителей Западной Сибири (n=72). В результате показана ассоциация аллеля С и генотипов (CC+GC) 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 1).

Таблица 1 – Распределение частот генотипов и аллелей rs2910164 (G>C) гена *MIR146A* в исследуемых группах

Генотип/ аллель	Пациенты с атеросклерозом сонных артерий, абс. (%)	Относительно здоровые индивиды, абс. (%)	χ^2 , p
GG	42 (37.5)	46 (63.9)	11.20, <0.001
GC	59 (52.7)	24 (33.3)	
CC	11 (9.8)	2 (2.8)	
G	143 (63.8)	116 (80.5)	10.96, <0.001
C	81 (36.2)	28 (19.5)	

Связь rs2910164 с патогенетическими значимыми признаками заболевания и биохимическими параметрами не была выявлена [Маннанова К., Зарубин А., 2020].

Данные секвенирования микроРНК могут использоваться для извлечения информации о полиморфных вариантах. Мы предложили алгоритм AdaptMIR, который позволяет более точно вырезать последовательности адаптера, фильтровать данные от некачественных прочтений и проводить подсчёт уровня экспрессии микроРНК [Зарубин А.А. и др., 2021].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием 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 эпигенетических механизмов формирования и течения атеросклеротического поражения артерий.

В настоящем исследовании впервые с использованием технологии miRNA-seq проведена оценка профилей экспрессии микроРНК в образцах БСА и ИСА, 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 [Fasolo F. et al., 2019]. Более того, полагают, что miR-21 является специфичным биомаркером «симптоматических» бляшек сонных артерий, связанных с острыми сосудистыми событиями [Markus V. et al., 2016].

При сравнении уровней экспрессии микроРНК между образцами БСА и ИСА выявлено 125 дифференциально-экспрессирующихся микроРНК. Данные микроРНК в значительной степени пересекаются с таковыми, вовлечёнными в развитие атеросклероза, согласно информации, представленной в базе HMDD. Причем некоторые из этих микроРНК являются перспективными биомаркерами и потенциальными мишенями для терапии атеросклероза. Например, miR-146a, проявляя атерогенный эффект, является биомаркером патологии, а также она демонстрирует антиатерогенные свойства при целевой доставке данной микроРНК к ГМК артерий [Smirnova A. et al., 2016; Fasolo F. et al., 2019]. Однако для 77 (62%) микроРНК, различающихся по уровню экспрессии между образцами БСА и ИСА, потенциальная связь с атеросклерозом установлена впервые в настоящей диссертационной работе.

Идентифицированные дифференциально-экспрессирующиеся микроРНК, формируют кластеры коэкспрессии, как между собой, так и с другими микроРНК, взаимодействуют с транскрипционными факторами, демонстрируют плеiotропное влияние в отношении регуляции многих генов-мишеней и показывают связь с патологиями сердечно-сосудистой системы, злокачественными новообразованиями и инфекционно-воспалительными заболеваниями.

В диссертационной работе впервые применен подход к деконволюции клеточного состава артерий с использованием данных по экспрессии микроРНК. В результате показано, что БСА и ИСА отличаются друг от друга по биоинформатически прогнозируемой доле клеточных компонент. Клеточный состав вносит существенный вклад в экспрессию микроРНК в сонных артериях у пациентов с атеросклерозом. Деконволюция клеточного состава БСА, рассчитанная на основании как метилирования ДНК, так и экспрессии микроРНК, позволила выявить кластеризацию образцов в зависимости от доли иммунных клеток. При сравнении БСА с ВЛИ и НЛИ обнаружено 42643 дифференциально-метилованных CpG-сайтов, из которых 10 CpG-сайтов располагаются в генах микроРНК, и 51 дифференциально-экспрессированная микроРНК.

Идентифицировано 18 микроРНК, уровень экспрессии которых различался между БСА и ИСА, а также ВЛИ и НЛИ. Среди них уровень экспрессии miR-326 показал корреляцию с уровнем метилирования расположенных рядом CpG-сайтов (cg08960830, $\rho = -0.78$, $p = 0.002$; cg25899829 $\rho = -0.76$, $p = 0.002$). 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 БСА.

С использованием экзомного секвенирования и авторского алгоритма для качественной подготовки данных микроРНК секвенирования с последующим извлечением генотипов (AdaptMIR), выявлено 24 SNPs, локализованных в 18 генах микроРНК, которые экспрессируются до зрелого состояния в БСА. Установлено, что вариант rs2682818 (*MIR618*) является кандидатом в отношении регуляции экспрессии miR-618 в БСА, а аллель С и генотипы (GC+CC) rs2910164 (*MIR146A*) ассоциированы с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий у славян-жителей Западной Сибири.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые проведена оценка профилей метилирования ДНК и экспрессии микроРНК в сонных артериях, а также экзомное секвенирование лейкоцитов периферической крови, полученных от одних и тех же пациентов с клинически выраженным атеросклерозом. Интегративный подход позволил выявить наиболее информативные, с точки зрения предикции их функциональной значимости, полиморфные варианты в генах микроРНК. Проведенное исследование расширяет имеющиеся представления о молекулярных механизмах атеросклероза, дополняя их новыми эпигенетическими компонентами и их взаимосвязью. Работа подчеркивает значительный вклад клеточного компонента в уровни экспрессии микроРНК и метилирования ДНК в артериях, а также предлагает подходы для анализа и коррекции клеточной гетерогенности образцов, что позволяет изучать сложные молекулярные механизмы регуляции активности генов, происходящие в клетках атеросклеротической бляшки в целом.

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 NK-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 NK-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-метилованных 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Назаренко М.С., Королёва Ю.А., Зарубин А.А., Слепцов А.А. Регулом микроРНК при различных фенотипах атеросклероза // Молекулярная биология. 2022. Т. 56(2). С. 227–243.
2. Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Bogaychuk P.M., Kuznetsov M.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. Human exome sequence data in support of somatic mosaicism in carotid atherosclerosis // Data in Brief. 2021. V. 39. P. 107656.
3. Зарубин А.А., Марков А.В., Слепцов А.А., Назаренко М.С. Деконволюция клеточного состава тканей на основе данных секвенирования микроРНК // Медицинская генетика. 2020. Т. 19 (12). С. 64–65.
4. Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П., Назаренко М.С. Проблема клеточной гетерогенности при анализе метилирования ДНК в образцах пораженных атеросклерозом артерий: биоинформатический подход // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2019. Т. 8 (S3-2). С. 37.
5. Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., Королёва Ю.А., Шарыш Д.В., Зарубин А.А., Валиахметов Н.Р., Гончарова И.А., Пузырев В.П., Муслимова Э.Ф., Панфилов Д.С., Козлов Б.Н., Афанасьев С.А. Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках сосудов у больных с клинически выраженным атеросклерозом // Биомедицинская химия. 2018. Т. 64(5). С. 416-422.

Тезисы конференций:

6. Маннанова К.В., Зарубин А.А. Полиморфизм генов микроРНК в атеросклеротических бляшках. // Сборник научных трудов XVII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. «Перспективы развития фундаментальных наук». Томск, 2020. С. 58-60.
7. Zarubin A.A., Nazarenko M.S., Markov A.V., Khasanova N.A., Nurillayeva N.M., Shoalimova Z.M. Referenced database for experimentally supported microRNA expression and atherosclerosis associations // Atherosclerosis. 2020. V. 315. P. e191–e192.
8. Zarubin A., Markov A., Nazarenko M., Sleptcov A. Identifying cell subtypes in the carotid atherosclerotic plaques by the deconvolution miRNA analysis // Двенадцатая международная конференция по биоинформатике, регуляции генома и структурной/системной биологии (Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology — BGRS\SB-2020). 2020. P. 560.

9. Зарубин А.А., Маннанова К.В., Марков А.В., Слепцов А.А. Идентификации функционально значимого полиморфизма в генах микроРНК с использованием интегрированных данных массового параллельного секвенирования. Сборник материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». Томск, 2020. С. 29-31.
10. Zarubin A., Markov A., Sharysh D., Nazarenko M., Puzyrev V., Barbarash O. Simultaneous analysis of DNA methylation and miRNA expression in atherosclerotic plaques of carotid arteries // *Atherosclerosis*. 2019. V. 287. P. e194–e195.
11. Зарубин А.А., Марков А.В., Шарыш Д.В., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П., Назаренко М.С. МикроРНК miR-326: согласованность изменений метилирования ДНК и экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий // Сборник научных трудов «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики». 2019. Вып. 12. Р. 25–27.
12. Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П., Назаренко М.С. Клеточная гетерогенность при анализе метилирования ДНК в пораженных атеросклерозом артериях // Сборник научных трудов «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики». 2019. Вып. 12. Р. 39–40.
13. Markov A., Zarubin A., Sharysh D., Golubenko M., Babushkina N., Valiakhmetov N., Barbarash O., Puzyrev V., Nazarenko M. Cell-type deconvolution from DNA methylation in carotid atherosclerotic plaques using bioinformatics approach // *Одиннадцатая международная школа молодых ученых (Systems Biology and Bioinformatics – SBB-2019)*. 2019. Р. 32.
14. Марков А.В., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Голубенко М.В., Бабушкина Н.П., Валиахметов Н.Р., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П., Назаренко М.С. Метилирование ДНК и клеточная гетерогенность в атеросклеротических бляшках сонных артерий у человека // Сборник тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». 2019. Р. 992.
15. Markov A., Zarubin A., Golubenko M., Babushkina N., Sharysh D., Valiakhmetov N., Kazantsev A., Burkov N., Barbarash O., Puzyrev V., Nazarenko M. DNA methylation level in carotid atherosclerotic plaques in the setting of leukocyte infiltration // *Atherosclerosis*. 2019. V. 287. P. e71.
16. Zarubin A., Markov A., Sharysh D., Barbarash O., Nazarenko M., Puzyrev V. Accounting leukocyte infiltration in genome-wide DNA methylation studies of atherosclerotic plaque // *Atherosclerosis*. 2018. V. 275. P. e190.
17. Markov A., Kucher A., Koroleva I., Sharysh D., Zarubin A., Kazantsev A., Barbarash O., Nazarenko M. DNA methylation profiling within microRNA genes in atherosclerotic plaque destabilization // *Atherosclerosis*. 2018. V. 275. P. e188–e189.
18. Markov A., Zarubin A., Nazarenko M., Kucher A., Koroleva I., Sharysh D., Kazantsev A., Barbarash O., Puzyrev V. DNA methylation and expression of microRNA genes in unstable carotid atherosclerotic plaques. // *Одиннадцатая международная конференция по биоинформатике, регуляции генома и структурной/системной биологии* 2018. Р.88.
19. Зарубин А.А., Марков А.В., Шарыш Д.В., Назаренко М.С., Барбараш О.Л., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Пузырев В.П. Связь экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий у человека с нестабильностью патологического процесса // В сборнике трудов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». 2018. С. 92-93.

20. Марков А.В., Кучер А.Н., Назаренко М.С., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Барбараш О.Л., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Пузырев В.П. Метилирование генов микроРНК при дестабилизации атеросклеротической бляшки // В сборнике трудов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». Р.102–103.
21. Марков А.В., Назаренко М.С., Кучер А.Н., Королёва Ю.А., Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Связь метилирования генов микроРНК со стабильностью атеросклеротической бляшки // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». 2018. С. 111-113.
22. Зарубин А.А., Марков А.В., Шарыш Д.В., Назаренко М.С., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Оценка уровня лейкоцитарной инфильтрации в атеросклеротической бляшке на основании данных о метилировании ДНК // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». 2018. С. 93–95.
23. Зарубин А.А., Марков А.В. Выявление кометилированных генов у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий // Сборник научных трудов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. «Перспективы развития фундаментальных наук». Томск, 2016. С. 39–41.

Программы для ЭВМ

24. «ADAPMIR». Авторы: Зарубин А.А., Марков А.В., Назаренко М.С. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2021615202, 05.04.2021. Правообладатели: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».
25. «MULTISNPR». Авторы: Марков А.В., Зарубин А.А., Назаренко М.С. Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ RU 2021610680, 18.01.2021. Правообладатели: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CpG-сайт – (от англ. cytosine – guanine site) – 5'-цитозин-фосфат-гуанин-3 сайт
 FDR – (англ. false discovery rate) – ожидаемая доля ложных отклонений
 miRNA-seq – (англ. microRNA sequencing) – микроРНК секвенирования
 SNPs – (англ. single nucleotide polymorphisms) – однонуклеотидный полиморфизм
 БСА – атеросклеротические бляшки сонных артерий
 ГМК – гладкомышечные клетки
 ИИ – ишемический инсульт
 ИСА – относительно интактная часть сонных артерий
 ЛП – липопротеины
 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
 ФБ – фибробласты
 ЭК – эндотелиальные клетки

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03
канд. биол. наук Хитринской И.Ю.
e-mail: khitrinskaya@tnimc.ru