

На правах рукописи



КОРОЛЁВА ЮЛИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**МЕТИЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ МИКРОРНК И ИХ РЕГУЛЯТОРНЫХ
ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ**

1.5.7 Генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2024

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:

Мешков Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт персонализированной терапии и профилактики, руководитель (г. Москва)

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», лаборатория молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ведущий научный сотрудник (г. Новосибирск)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

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 тракт, д. 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 «__» _____ 202__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования.

Атеросклероз представляет собой комплексное поражение артерий, характеризующееся хроническим воспалением и ремоделированием сосудистой стенки, которое, в итоге, приводит к формированию атеросклеротических бляшек. На поздних стадиях атеросклеротического поражения сонной артерии разрыв или эрозия нестабильной бляшки приводит к адгезии тромбоцитов, формированию тромбов, окклюзии артерий и острым ишемическим нарушениям, среди которых – ишемический инсульт и хронические формы недостаточности кровоснабжения мозга, лежащие в основе наиболее частых причин смертности и инвалидности в мире [Захаров В.В., 2007; Puig N. et al., 2020; Сергиенко И.В., Аншелес А.А., 2021].

Практически во все биологические процессы на всех стадиях развития атеросклероза (от ранней дисфункции эндотелия до эрозии или разрыва нестабильной атеросклеротической бляшки) вовлечены микроРНК – малые регуляторные биомолекулы, которые представляют собой некодирующие одноцепочечные РНК длиной от 16 до 27 нуклеотидов [Fang Z. et al., 2013; Королёва Ю.А. с соавт., 2018; Lu Y. et al., 2018; Fasolo F. et al., 2019; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Schober A. et al., 2022; Badacz R. et al., 2022; Vartak T. et al., 2022]. Механизм действия микроРНК заключается, преимущественно, в негативной регуляции экспрессии генов через связывание с гомологичной последовательностью (обычно в пределах 3'-нетранслируемой области) мРНК-мишени в цитоплазме клеток и запуск её расщепления или подавление трансляции мРНК [Friedman R.C. et al., 2009; Catalanotto C. et al., 2016; Кучер А.Н., Бабушкина Н.П., 2011; Lu Y. et al., 2018; Sum H., Brewer A.C., 2023].

Экспрессия самих микроРНК контролируется, в том числе, посредством эпигенетических механизмов, одним из которых является метилирование CpG-островков (скоплений CpG-динуклеотидов), перекрывающих промоторные участки генов или локализованных рядом с сайтом начала транскрипции микроРНК [Логинов В.И. с соавт., 2015; Morales S. et al., 2017]. Обычно CpG-островки гипометилированы, а их избыточное гиперметилирование подавляет транскрипцию соответствующих генов [Chhabra R., 2014; Ma J. et al., 2014; Piletič K., Kunej T., 2016]. Однако регуляция экспрессии микроРНК посредством метилирования ДНК происходит и вне CpG-островков [Baer C. et al., 2013]. В частности, контроль экспрессии интронных микроРНК может осуществляться в области их собственных промоторов и обладает тканевой и клеточной специфичностью [Marsico A. et al., 2013]. Кроме того, изменение метилирования ДНК в области энхансеров также может модулировать экспрессию микроРНК [Bell R.E. et al., 2016]. В случае метилирования гена «вокруг» TSS точки старта транскрипции наблюдается преимущественно отрицательная корреляция с экспрессией, но уровень метилирования в «теле» гена и экспрессия генов коррелируют, напротив, положительно [Deng J. et al., 2009].

Большинство работ в отношении анализа метилирования ДНК в регуляторных элементах генов микроРНК выполнены в отношении онкологических заболеваний. Исследований, в которых анализируется связь изменения метилирования в области генов микроРНК при других многофакторных заболеваниях, в том числе при атеросклерозе, существенно меньше [Fernández-Sanlés A. et al., 2017; Tabaei S., Tabaei S.S., 2019; Huang Z. et al., 2019; Huan T. et al., 2020; Sharma A.R. et al., 2020; Vancheri C. et al., 2023]. При этом большая часть данных экспериментов проведена *in vitro* на различных типах клеток и в моделях на животных. Клинические исследования, рассматривающие вариабельность экспрессии микроРНК при нестабильности атеросклеротических бляшек у человека, немногочисленны, а анализ уровня метилирования регуляторных элементов генов микроРНК, определённых в данных исследованиях, при атеросклеротическом поражении сонных артерий практически не проводился.

В связи с этим, актуальным представляется выявление регуляторных элементов генов микроРНК, экспрессия которых связана с нестабильностью атеросклеротических бляшек, и анализ их метилирования в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах крови при осложненном течении атеросклероза сонных артерий. Определение молекулярных механизмов, приводящих к нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий, может открыть новые возможности для профилактики и лечения острых сосудистых событий.

Степень научной разработанности темы исследования.

В настоящее время многие обзоры и экспериментальные статьи посвящены изучению роли микроРНК в развитии и прогрессии атеросклероза [Cipollone F. et al., 2011; Raitoharju E. et al., 2011; Madrigal-Matute J. et al., 2013; Santovito D. et al., 2013; Kumar S. et al., 2014; Andreou I. et al., 2015; Volný O. et al., 2015; Feinberg M.W., Moore K.J., 2016; Santovito D. et al., 2016; Laffont B., Rayner K.J., 2017; Lu Y., et al., 2018; Collura S. et al., 2020; Назаренко М.С. с соавт., 2022; Schober A. et al., 2022; Badacz R. et al., 2022; Vartak T. et al., 2022]. Для отдельных микроРНК показано изменение уровня экспрессии в поражённых атеросклерозом сонных артериях относительно интактных артерий (miR-21, miR-145 и miR-221) [Raitoharju E. et al., 2011; Cao J. et al., 2014; Markus B. et al., 2016], а также связь с нестабильностью атеросклеротических бляшек у человека (miR-21, -100, -127, -133a/b, -143/145, -221) [Cipollone F. et al. 2011; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019].

В полногеномных исследованиях метилирования ДНК при атеросклерозе артерий различной локализации, как правило, анализируется уровень метилирования CpG-сайтов, расположенных в промоторах белок-кодирующих генов в клетках крови [Istas G. et al., 2017; Liu Y. et al., 2017; Soriano-Tárraga C. et al., 2018; Sharma A. R. et al., 2020]. Меньшее внимание уделяется изменению метилирования ДНК в тканях артерий при их атеросклеротическом поражении [Castillo-Díaz S.A. et al., 2010; Fernandez A.F. et al., 2011; Zaina S. et al., 2014; Aavik E. et al., 2015; Nazarenko M.S. et al., 2015; Zaina S. et al., 2015; Li J. et al., 2021]. В поражённых атеросклерозом тканях артерий относительно интактных тканей сосудов было выявлено как снижение уровня метилирования в области, охватывающих гены микроРНК [Марков А.В. с соавт., 2014; Nazarenko M. S. et al., 2015, Aavik E. et al., 2015], так и повышение [Ehrlich K.C. et al., 2019]. В то же время данные по анализу уровня метилирования регуляторных элементов генов микроРНК при нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий человека в литературных источниках отсутствуют. Неясным остается вопрос о связи уровня метилирования генов микроРНК и экспрессии зрелых молекул. Выявление закономерностей изменения уровня метилирования генов микроРНК в клетках и тканях пациентов с клинически выраженным атеросклерозом может дать основу для установления потенциальных биомаркеров развития и прогноза осложненного течения данной патологии.

Цель исследования: охарактеризовать метилирование в генах микроРНК и их регуляторных элементах при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклероза сонных артерий.

Задачи исследования:

1. Проанализировать уровень метилирования CpG-сайтов отдельных генов микроРНК (miR-10b, miR-21, miR-143/-145, miR-100 и miR-127) и их регуляторных элементов в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы с помощью массового параллельного секвенирования.

2. Оценить связь метилирования анализируемых регионов генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и лейкоцитах крови индивидов с развитием клинически выраженного атеросклероза, а также с патогенетически значимыми клиническими и гистологическими параметрами нестабильности атеросклеротических бляшек.

3. Выявить дифференциально метилированные CpG-сайты в генах микроРНК и их регуляторных элементах в зависимости от клинической и гистологической нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий с помощью метилочипов Illumina.

4. Проанализировать связь экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и уровня метилирования анализируемых CpG-сайтов в генах микроРНК и их регуляторных элементах.

Научная новизна исследования.

В результате исследования впервые оценена связь метилирования регуляторных регионов широкого спектра генов микроРНК с развитием и осложненным течением атеросклероза в отношении острых сосудистых событий и гистологически нестабильной атеросклеротической бляшки сонных артерий. Получены новые данные о тканеспецифичности метилирования регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* в сосудах (сонные артерии, большие подкожные вены) и лейкоцитах крови у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. Установлены разнонаправленные корреляции между метилированием регуляторных регионов данных генов: в атеросклеротической бляшке – с отдельными параметрами гистологической нестабильности, а в лейкоцитах периферической крови пациентов – с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками. Выявлена ассоциация атеросклеротического поражения и его нестабильного течения с преимущественным гипометилированием в области широкого спектра генов микроРНК и их регуляторных элементов в клетках сонных артерий. Показано, что микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых изменяется уровень метилирования ДНК при нестабильном течении атеросклероза, взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, а их мишени участвуют в регуляции процессов развития (в т.ч. программируемой клеточной гибели), транскрипции, ответе на эндогенные стимулы, фосфорилировании белка, метаболизме липидов, организации внеклеточного матрикса и фокальной адгезии. В атеросклеротических бляшках установлена разнонаправленная корреляция уровня метилирования в области генов микроРНК и экспрессии микроРНК. В клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий в промоторах генов *MIR10B*, *MIR143*, *MIR143HG* (*CARMN*), и *MIR23B* идентифицированы cis-miR-eQTMс, которые могут быть значимы в отношении формирования и нестабильного течения атеросклероза.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные в ходе выполнения диссертационного исследования фундаментальные знания расширяют представление о вариабельности метилирования регуляторных элементов генов микроРНК в атеросклеротических бляшках и лейкоцитах периферической крови при осложненном течении атеросклероза сонных артерий. Выявленные корреляции между метилированием регуляторных регионов генов микроРНК, экспрессией микроРНК и гистологически/ клинически значимыми признаками развития и осложненного течения атеросклероза дают основание для проведения дополнительных исследований с целью установления причинно-следственных связей между ними и поиска биомаркеров развития острых сосудистых событий. Полученные данные о связи изменения уровня метилирования генов микроРНК и их регуляторных элементов с вариабельностью экспрессии этих микроРНК при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклероза, а также данные о предполагаемых молекулярных путях и регуляторных осях, в которых участвуют микроРНК и их мишени, могут быть использованы в целях поиска новых мишеней для таргетной терапии атеросклероза. Сформированная коллекция биологического материала тканей сосудов и клеток крови пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий может быть использована для проведения дальнейших исследований в области генетики сердечно-сосудистых заболеваний.

Методология и методы исследования.

В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования пациентов с атеросклерозом сонных артерий, а также гистологического анализа тканей артерий, молекулярно-генетического, статистического и биоинформатического анализа.

Молекулярно-генетические методы включали выделение ДНК и РНК, ПЦР, синтез библиотек для секвенирования, высокопроизводительное массовое параллельное секвенирование. Обработка данных, описательный и сравнительный анализ результатов выполнены с помощью стандартных пакетов в программной среде R.

Проведение диссертационного исследования одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол № 4 от 25.11.2019 г.). Экспериментальные работы были проведены на базе Центра коллективного пользования «Медицинская геномика» Томского НИМЦ.

Положения, выносимые на защиту:

1. Тканеспецифичность метилирования генов микроРНК выражается в более высоком уровне метилирования *MIR21*, *MIR127*, регуляторных элементов *MIR100* и *MIR143* и в более низком уровне метилирования *MIR10B* и *MIR143* в лейкоцитах периферической крови по сравнению с тканями сосудов, независимо от наличия атеросклероза сонных артерий. В пораженных атеросклерозом сонных артериях отмечается снижение метилирования в гене *MIR10B*, в «теле» *MIR21* и *MIR143*, а также в области регуляторного элемента E-box гена *MIR100* по сравнению с интактными сосудами.

2. Уровень метилирования ДНК в области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR143* и *MIR127* в атеросклеротической бляшке ассоциирован с отдельными параметрами гистологической нестабильности, а в лейкоцитах периферической крови пациентов – с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками.

3. Клинически и гистологически нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий по сравнению с интактными артериями характеризуются гипометилированием CpG-сайтов в области генов и регуляторных элементов микроРНК, которые взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, а их мишени вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: процессы развития (в том числе программируемая клеточная гибель), транскрипция, ответ на эндогенные стимулы, фосфорилирование белка, метаболизм липидов, организация внеклеточного матрикса и фокальная адгезия.

4. В атеросклеротических бляшках сонных артерий в генах *MIR10B*, *MIR143*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR23B* выявлены cis-miR-eQTMс с отрицательной и положительной корреляцией уровня метилирования ДНК и экспрессии ближайших микроРНК, потенциально вовлеченных в формирование и нестабильное течение атеросклероза через регуляторные оси miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ABCA1, miR-27b-3p/ABCA1, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

Степень достоверности результатов.

Достоверность полученных результатов обеспечивается полнотой теоретического анализа материала, методологической обоснованностью исследования, достаточным объемом и репрезентативностью выборок экспериментальной и контрольной групп, применением современных, общепринятых и корректных методов клинического и параклинического обследования пациентов, гистологического анализа тканей артерий, молекулярно-генетического, статистического и биоинформатического анализа и корректностью в интерпретации полученных результатов.

Апробация работы.

Основные результаты исследования по теме диссертационной работы были представлены на XI научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 35-летию НИИ медицинской генетики» (Томск, 2017); Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2018); XXV межрегиональной научно-практической конференции «Современные молекулярно-биологические и генетические технологии в медицинской практике» (Новосибирск, 2018); I Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2018); I Всероссийском конгрессе с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования» с сателлитным симпозиумом молодых ученых «Перспективы физиологии сердца и сосудов» (Кемерово, 2019), XII научной конференции «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики» (Томск, 2019), II Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (онлайн участие, 2020), Втором Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (онлайн участие, 2021), III Всероссийском конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (онлайн участие, 2022), XIII научной конференции «Генетика человека и патология» (Томск, 2022), Четвёртом Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (онлайн участие, 2023).

Стендовый доклад на XI научной конференции «Генетика человека и патология» (2017 г.) оценен дипломом за I место; выступления на II (2021 г.) и IV (2023 г.) форумах «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» отмечены дипломами за III место и I место в конкурсе молодых ученых соответственно.

Личный вклад автора.

Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, выбор исследуемых регионов, проведение полимеразной цепной реакции, анализ и статистическая обработка результатов секвенирования, анализ внешних данных из открытых источников и баз выполнены лично автором. Соискатель участвовал на всех этапах обсуждения полученных результатов, их публикации и лично представлял результаты исследования на научных конференциях. Обобщение результатов и написание текста диссертации также проведено лично автором.

Публикации.

По теме диссертационного исследования опубликовано 34 работы, в том числе 7 статей в журналах Перечня ВАК РФ, 23 публикации – статьи в сборниках и тезисы конференций.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 203 страницах машинописного текста и включает введение, основные главы (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение), выводы, список литературы и 5 приложений. Работа иллюстрирована 46 рисунками и 12 таблицами. Библиография включает 278 литературных источников, из них 19 источников отечественной и 259 источников зарубежной литературы, а также 12 интернет-ресурсов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование включает 4 блока (Рисунок 1). Формирование выборок и клиническая характеристика пациентов с атеросклерозом сонных артерий проходили на базе Научно-исследовательский институт кардиологии – филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (г. Томск). Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в эксперименте.

От 92 пациентов со значительным стенозом сонной артерии в ходе планового оперативного хирургического вмешательства получены образцы тканей сосудов - атеросклеротических бляшек (АСБ), макроскопически неизмененных участков сонных артерий и больших подкожных вен. До операции у каждого пациента были взяты образцы периферической крови.

Каждый образец АСБ был разделен на 3 равных фрагмента схожих по макроморфологической картине. Из одного фрагмента выделена геномная ДНК (1 блок), второй фрагмент использован для гистологического анализа, проводимого по единому протоколу (2 блок), а третий использован для выделения РНК и анализа экспрессии микроРНК (4 блок).

От 32 индивидов сопоставимых по полу и возрасту, включенных в контрольную группу, получены образцы периферической крови. Весь биологический материал был заморожен в жидком азоте и хранился при температуре -80°C вплоть до исследования.

Молекулярно-генетические методы.

1 блок. Для выделения ДНК был использован стандартный метод фенол-хлороформной экстракции. Бисульфитная модификация ДНК проведена с использованием набора EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Германия), анализ метилирования ДНК (CpG-сайтов) в области выбранных генов микроРНК осуществлен методом бисульфитного секвенирования ампликонов (Bisulfite Amplicon Sequencing) с использованием технологии высокопроизводительного массового параллельного секвенирования на приборе MiSeq (Illumina, США) [Masser D.R. et al., 2015] согласно стандартным протоколам производителей.

4 блок. Микрочиповое исследование бисульфитно-модифицированной ДНК выполнено на платформе Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina). Выделение РНК для анализа экспрессии производилось из фрагментов тех же образцов сонных артерий 16 пациентов, которые были взяты в анализ уровня метилирования ДНК на микрочипах Тотальная РНК,

включая микроРНК, была выделена после предварительной гомогенизации ткани на приборе Minilys (Bertin Tech, Франция) с использованием реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу производителя. Подготовка библиотек для секвенирования микроРНК была проведена с использованием набора NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs, США). Анализ экспрессии микроРНК по стандартному протоколу включал лигирование 3'-SR-адаптера, гибридизация праймера для обратной транскрипции, лигирование 5'-SR-адаптера, обратная транскрипция, амплификация с индексированными праймерами и отбор малых РНК с помощью AMPure XP Bead (Beckman Coulter, США). Секвенирование кДНК-библиотек выполнялось на приборе HiSeq 1500 (Illumina, США).



Рисунок 1. Дизайн исследования.

Биоинформатические и статистические методы.

1-2 блок. Для определения локализации регуляторных элементов выбранных микроРНК использованы базы данных FANTOM5 [De Rie D. et al., 2017] и TRmir [Gao Y. et al., 2022]. Подбор праймеров для бисульфитного секвенирования проведен с помощью онлайн-инструментов MethPrimer 2, MethPrimer [Li L.C., Dahiya R., 2002], IDT OligoAnalyzer, BiSearch ePCR. Обработка данных, описательный и сравнительный анализ результатов выполнены с помощью стандартных пакетов в программной среде R (версия 4.1.2 и более ранние версии) [R Core Team].

Оценкой уровня метилирования служила величина β (индекс метилирования), которая рассчитывалась как доля прочтений, соответствующих метилированным остаткам цитозина, по отношению ко всем прочтениям цитозина в данной позиции генома, выраженная в процентах.

Для описания и сравнения результатов бисульфитного секвенирования ДНК использовались методы непараметрической статистики (критерии Уилкоксона и Манна-Уитни), для оценки зависимости между переменными – коэффициент корреляции Спирмена (ρ). Поправка при множественной проверке статистических гипотез проведена по методу Бенджамини-Хохберга [Benjamini Y., Hochberg Y., 1995].

Кроме того, были привлечены внешние данные из электронного репозитория Gene Expression Omnibus (GEO) — шесть наборов данных, из которых три (GSE66500, GSE46401, GSE149759) содержат информацию о метилировании ДНК в стенках кровеносных сосудов различных русел, два (GSE69138, GSE107143) включают данные о метилировании ДНК в цельной крови и один (GSE62867) содержит информацию о метилировании как в тканях сосудов, так в лейкоцитах периферической крови.

3 блок. Для анализа привлечены внешние данные по уровню метилирования ДНК в гистологически нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) и без такового события в анамнезе, из электронного репозитория GEO, идентификатор доступа GSE149759 [Li J. et al., 2021]. При анализе и описании данных использованы биоинформатический алгоритм HEPiDISH, база данных TRmir, онлайн-инструмент TAM 2.0, база данных Gene Ontology (GO), классификатор сигнальных и метаболических путей KEGG, онлайн-инструменты Metascape, DIANA-miRPath v4.0, базы данных miRDB, TarBase, TargetScan и MirTarBase.

4 блок. Обработка данных секвенирования микроРНК выполнена с помощью набора программ miARma-Seq [Andrés-León E. et al., 2018]. Дифференциальную экспрессию микроРНК оценивали в программной среде R с использованием статистического пакета EdgeR. Для сравнения результатов по экспрессии возможных генов-мишеней микроРНК использовали портал GTEx v.8 и интерактивное веб-приложение PlaqView [Ma W.F. et al., 2021], содержащее наборы данных по транскриптому единичных клеток атеросклеротических бляшек сонных артерий под идентификаторами «Alsaigh_2020» (GSE159677) [Alsaigh T. et al., 2022], «Pan_2020» (GSE155512, GSE155514) [Pan H. et al., 2020] и «Slenders_2021» [Slenders L. et al., 2021]. Данные GSE155512 и GSE159677 были объединены, нормализованы и обработаны по стандартному протоколу, с использованием библиотеки Seurat и алгоритма снижения размерности umap.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ уровня метилирования CpG-сайтов генов микроРНК и их регуляторных элементов в атеросклеротических бляшках и интактных сосудах, а также в лейкоцитах крови пациентов с атеросклерозом сонных артерий и контрольной группы с помощью массового параллельного секвенирования

Согласно данным научных публикаций, в более чем двух работах показано изменение экспрессии miR-10b, miR-21, miR-143/145, miR-100 и miR-127 в сонных артериях при формировании и нарушении стабильности атеросклеротической бляшки [Cipollone F. et al. 2011; Lovren F. et al., 2012; Nazari-Jahantigh M. et al., 2012; Cao J. et al., 2014; Bazan H.A. et al., 2015; Maitrias P. et al., 2015; Markus B. et al., 2016; Jin H. et al., 2018; Katano H. et al., 2018; Wang H. et al., 2019; González-López et al., 2022]. В связи с этим, на первом этапе диссертационного исследования в качестве регуляторных элементов генов микроРНК для анализа их уровня метилирования выбраны восемь областей: CpG-островок *MIR10B*; предполагаемый промоторный регион, область CpG-островка и «тела» *MIR21*; E-бокс регион *MIR100*; CpG-островок (охватывающий «тело» гена) *MIR127*; предполагаемый промоторный регион (он же промотор гена длинной некодирующей РНК *MIR143HG* (*CARMN*), гена-хозяина *MIR143*) и «тело» *MIR143*. По каждому региону была рассчитана погрешность измерения метилирования ДНК в поражённых и непоражённых атеросклерозом сонных артериях, в больших подкожных венах и в лейкоцитах периферической крови.

В результате исследования выявлено, что уровень метилирования ДНК во всех проанализированных регионах генов микроРНК (*MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143*) имеет тканеспецифичный характер и различается между лейкоцитами периферической крови (ЛПК) индивидов (пациентов или контроля) и тканями сосудов — атеросклеротическими бляшками сонных артерий, интактными участками сонных артерий или большими подкожными венами (Рисунок 2).

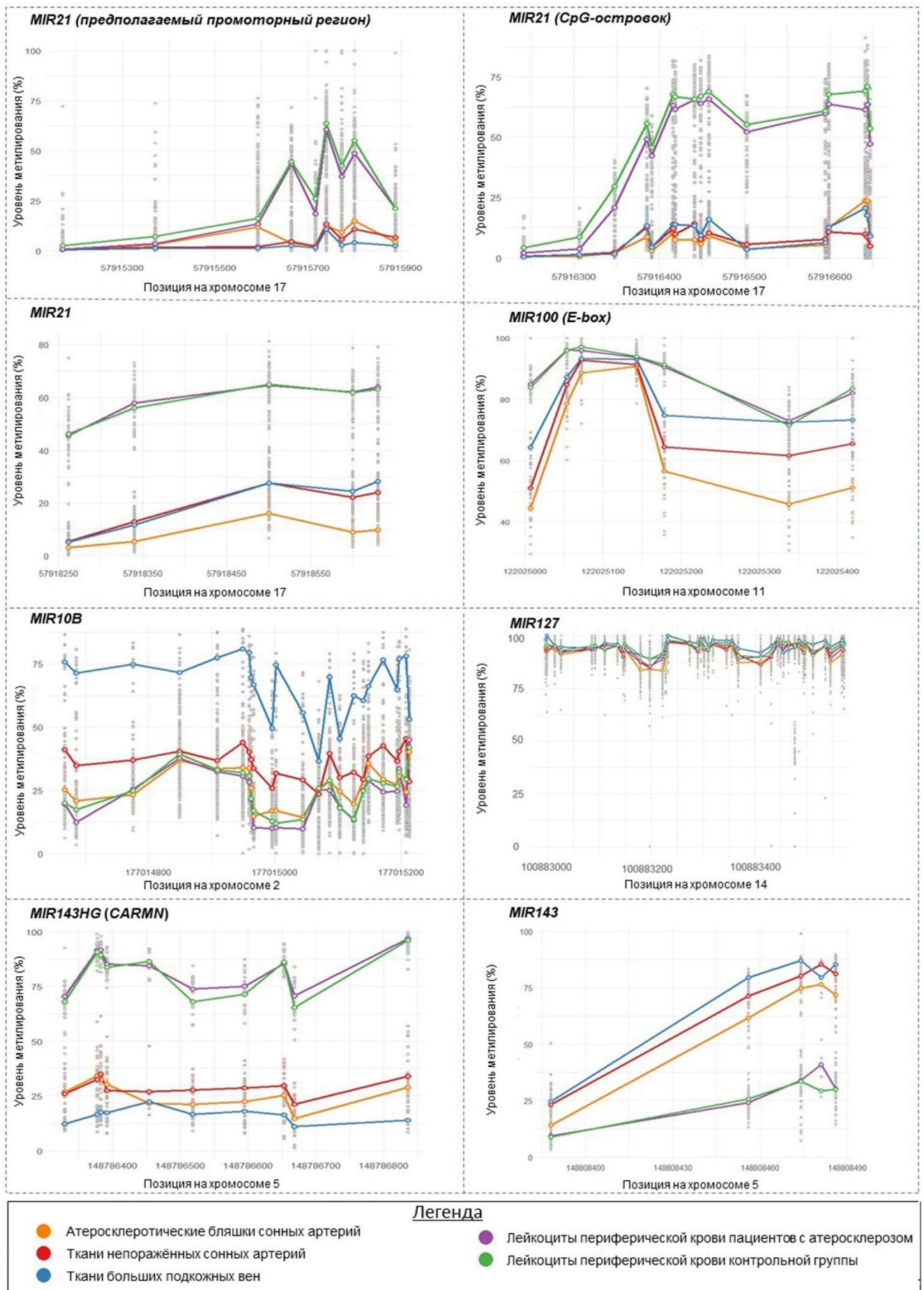


Рисунок 2. Профили метилирования CpG-сайтов в исследуемых регионах генов микроРНК (*MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143*).

Координаты даны по сборке генома GRCh37/hg19.

Более низкий уровень метилирования в ЛПК по сравнению с тканями сосудов отмечен в отношении CpG-островка гена *MIR10B* (24,0-26,5% vs. 26,9-70,8%, $p<0,016$) и «тела» гена *MIR143* (27,5-27,7% vs. 67,8-82,2%, $p<0,001$). Противоположная картина – значимое повышение уровня метилирования ДНК в лейкоцитах относительно тканей сосудов показана для всех регионов гена *MIR21* – промотора (30,3-36,8% vs. 1,7-5,7%, $p<0,001$), CpG-островка (62,4-66,1% vs. 7,2-12,7%, $p<0,001$) и «тела» (61,4-61,8% vs. 8,7-24,5%, $p<0,001$), *MIR100* (62-66% vs. 7-13%, $p<0,001$) и *MIR143HG* (*CARMN*) (83,5-84,4% vs. 17,4-29,3%, $p<0,001$). Наблюдаемые различия превышали максимальную погрешность измерения метилирования ДНК, рассчитанную для каждого региона и типа ткани.

Для CpG-островка гена *MIR127* во всех типах изучаемых тканей по абсолютному большинству CpG-сайтов выявлен высокий уровень метилирования (>80%). Исключение составил CpG-сайт, совпадающий с однонуклеотидным полиморфизмом rs34163305:C>T. В этом случае альтернативный аллель Т приводит к отсутствию CpG-динуклеотида, следовательно, у гомозигот по минорному аллелю уровень метилирования равен 0%, а у гетерозигот находится в области 50%. Наиболее высокий уровень метилирования в области CpG-островка и «тела» гена *MIR127* (достигающий 100% по отдельным CpG-сайтам, в среднем по региону 95,4%) среди всех исследованных тканей сосудов выявлен в больших подкожных венах, которые не подвержены атеросклеротическому поражению. В нескольких последовательных CpG-сайтах в области CpG-островка гена *MIR127* установлено снижение уровня метилирования в поражённых сонных артериях по сравнению с венами: для региона chr14:101,349,589-101,349,731 минимальная и максимальная разница уровней метилирования между поражёнными сонными артериями и большими подкожными венами составила 2,21% и 5,47%, а для chr14:101,349,772-101,349,833 – 2,40% и 7,07% соответственно. Для единичных CpG-сайтов, приходящихся на вышеуказанные регионы также было установлено снижение уровня метилирования в лейкоцитах пациентов с атеросклерозом по сравнению с большими подкожными венами (от 1,8 до 5,5%).

Уровень метилирования CpG-сайтов в поражённых атеросклерозом сонных артериях был значимо снижен по сравнению с интактными сосудами (Рисунок 2) в области CpG-островка *MIR10B* (на 8,5%, $p<0,001$), в «теле» *MIR21* (на 11,7%, $p<0,001$), в области регуляторного элемента E-box *MIR100* (на 9,6%, $p<0,001$) и в «теле» *MIR143* (на 6,9%, $p=0,019$). Предполагаемый промоторный регион гена *MIR21*, наоборот, характеризовался гиперметилированием в АСБ по сравнению с венами (5,7% vs 1,7%, $p=0,021$).

Таким образом, для всех анализируемых регионов генов микроРНК показана связь уровня метилирования ДНК с формированием атеросклеротического процесса в сонных артериях. При этом атеросклеротическое поражение сонных артерий преимущественно характеризуется гипометилированием регуляторных элементов и «тела» генов микроРНК.

Анализ связи метилирования анализируемых регуляторных элементов генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий и лейкоцитах крови индивидов с развитием клинически выраженного атеросклероза, а также с патогенетически значимыми клиническими и гистологическими параметрами нестабильности атеросклеротических бляшек

При анализе метилирования ДНК анализируемых регионов в атеросклеротических бляшках сонных артерий с патогенетически значимыми клиническими параметрами, обнаружено умеренное увеличение (на 3,1%) уровня метилирования CpG-сайта в области регуляторного элемента E-box гена *MIR100* (chr11:122,025,143) в клетках АСБ у пациентов с наличием метаболического синдрома по сравнению с таковыми без него (Рисунок 3). При этом различия уровня метилирования ДНК (3,1%) превышают рассчитанную погрешность измерения метилирования CpG-сайтов в области гена *MIR100* в артериях (1,4%), следовательно, можно говорить о повышении уровня метилирования chr11:122,025,143 при метаболическом синдроме.

Известно, что метаболический синдром выступает фактором риска атеросклероза. В работе Pankratz F. с соавт. (2018) показано значительное подавление экспрессии miR-100 в АСБ, богатых макрофагами и характеризующихся большим содержанием липидов, в результате чего происходит mTOR- и NF-κB-зависимая активация воспаления сосудов [Pankratz F. et al., 2018].

У пациентов с ожирением и сахарным диабетом 2 типа снижен уровень miR-100 в сыворотке и в жировой ткани [Pek S.L. et al., 2016]. Более того, в эксперименте на модельных животных показано системное протективное влияние гиперэкспрессии miR-100 при метаболическом синдроме, вызванном диетой с высоким содержанием жиров [Smolka C. et al., 2021].

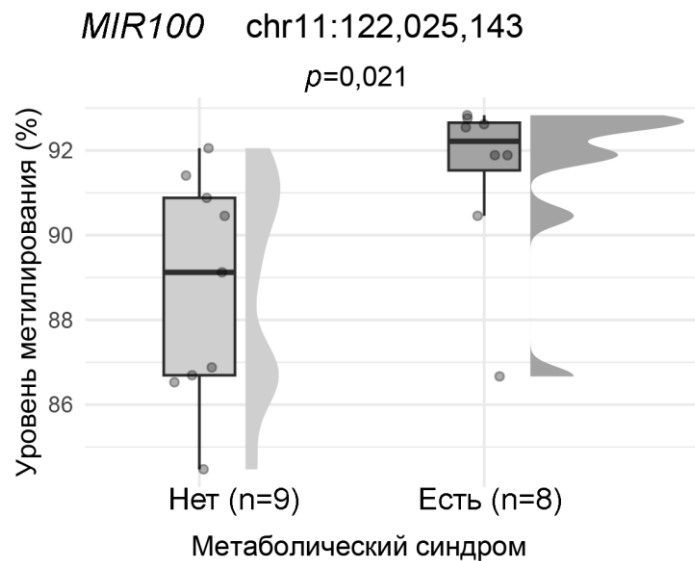


Рисунок 3. Уровень метилирования CpG-сайта chr11:122,025,143 предполагаемого регуляторного региона *MIR100* в АСБ сонных артерий в зависимости от наличия метаболического синдрома у пациентов.

Анализ связи метилирования анализируемых регионов генов микроРНК и гистологической нестабильности АСБ позволил установить корреляции между метилированием отдельных CpG-сайтов генов микроРНК и изучаемыми параметрами. Так, уровень метилирования CpG-сайтов гена *MIR10B* снижался при наличии тромботических масс на поверхности АСБ (на 20%, $p < 0,001$), обратно коррелировал с количеством макрофагов ($\rho = -0,345$, $p = 0,045$), и прямо – с количеством пенистых клеток в ядре АСБ ($\rho = 0,538$, $p < 0,032$).

Для 8 CpG-сайтов в области CpG-островка гена *MIR127* показаны единичные обратные корреляции с такими показателями как толщина покрышки АСБ (3 CpG-сайта, $\rho < -0,392$, $p < 0,043$), размер ядра бляшки (3 CpG-сайта, $\rho < -0,424$, $p < 0,035$), количество макрофагов ($\rho = -0,571$, $p = 0,005$), лимфоцитов ($\rho = -0,502$, $p = 0,006$) и нейтрофилов (2 CpG-сайта, $\rho < -0,673$, $p < 0,033$). В то же время для двух CpG-сайтов гена *MIR127* отмечена прямая корреляция с количеством макрофагов ($\rho = 0,410$, $p = 0,037$), лимфоцитов ($\rho = 0,405$, $p = 0,018$) и пенистых клеток ($\rho = 0,684$, $p = 0,042$).

В отношении связи метилирования ДНК и гистологической нестабильности АСБ показано изменение уровня метилирования не только отдельных CpG-сайтов, но и отдельных регионов в целом. В области «тела» гена *MIR21* более высокий уровень метилирования ассоциирован с кальцификацией в области «плеча» АСБ (на 2,9%, $p = 0,044$), а снижение уровня метилирования предполагаемого промоторного региона данного гена в АСБ связано с наличием кровоизлияний (на 7,3%, $p = 0,019$) и пенистых клеток (на 7,0% $p = 0,032$).

Таким образом, взаимосвязь уровня метилирования в области генов микроРНК с количеством воспалительных клеток неоднозначна и разнонаправленная корреляция может наблюдаться не только для разных генов микроРНК (например, при наличии пенистых клеток в атеросклеротической бляшке отмечается повышение метилирования в области *MIR10B* и снижение – в «теле» гена *MIR21*), но и для сайтов в одном и том же гене – для *MIR127* отмечена разнонаправленная корреляция разных CpG-сайтов с количеством макрофагов и лимфоцитов.

При анализе связи уровня метилирования ДНК в АСБ сонных артерий с ОНМК в анамнезе пациентов значимое повышение уровня метилирования ($p < 0,046$) отмечено только для 7 отдельных CpG-сайтов гена *MIR127*, однако различия в уровне метилирования составили 2-4%, с максимальным уровнем для двух соседних CpG-сайтов: chr14:101,349,509 (7,7%, $p = 0,023$) и

chr14:101,349,515 (6,9%, $p=0,001$). Для других регионов либо не было отмечено различий (*MIR10B*, промотор и CpG-островок гена *MIR21*), либо анализ связи с ОНМК не проводился («тело» гена *MIR21*, *MIR100*, 2 региона *MIR143*).

Уровень метилирования *MIR21* (область «тела» гена), *MIR100* (E-box) и обоих регионов *MIR143* в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий не отличается от таковых относительно здоровых индивидов сопоставимого возраста. Однако в ЛПК пациентов по сравнению с контролем выявлено гипометилирование отдельных CpG-сайтов гена *MIR21* в предполагаемом промоторном регионе (на 1,5-7,5%, $p<0,015$) и CpG-островке (на 2,0-8,7%, $p<0,038$). Два CpG-сайта (chr2:177,014,966 и chr2:177,015,208) анализируемого региона гена *MIR10B* были гипометилированы в ЛПК пациентов по сравнению с контрольной группой (на 7%, $p=0,019$ и 10%, $p=0,047$, соответственно), а уровень их метилирования отрицательно коррелировал с уровнями общего холестерина ($\rho=-0,627$, $p<0,001$; $\rho=-701$, $p<0,001$, соответственно) и липопротеинов низкой плотности ($\rho=-0,636$, $p=0,026$; $\rho=-643$, $p=0,024$, соответственно), индексом атерогенности ($\rho=-0,772$, $p=0,003$; $\rho=-789$, $p=0,002$, соответственно) и степенью стеноза сонных артерий ($\rho=-0,490$, $p=0,002$; $\rho=-470$, $p<0,001$, соответственно).

В ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий в генах *MIR143* (в области предполагаемого промоторного региона *MIR143HG* и «тела» гена) и *MIR127* (CpG-островка и «тела» гена) обнаружены разнонаправленные корреляции уровня метилирования отдельных CpG-сайтов с возрастом и патогенетически значимыми признаками атеросклероза (показатели липидного обмена, уровень глюкозы в крови и степень стеноза сонных артерий). Причем с патогенетически значимыми признаками атеросклероза установлена умеренная отрицательная корреляция уровня метилирования CpG-сайтов в регуляторных элементах генов *MIR143* (промотор) и *MIR10B* (CpG-островок), сильная положительная корреляция для области «тела» гена *MIR143* и умеренные разнонаправленные корреляции – для CpG-островка гена *MIR127*. Не исключено, что уровень метилирования этих регионов генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR127* и *MIR143* в ЛПК может быть биомаркером развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий.

При сравнении уровня метилирования анализируемых регионов генов микроРНК в ЛПК пациентов с атеросклерозом сонных артерий в сочетании с ОНМК в анамнезе и без такого события статистически значимых различий не выявлено. Полученные результаты настоящего исследования по уровню метилирования генов микроРНК в целом согласуются с таковыми микрочиповых исследований, причём рисунок метилирования аннотированных на микрочипах CpG-сайтов генов микроРНК показывает большее сходство между различными исследованиями в ЛПК, чем в тканях сосудов. Это может быть отражением различий в методических подходах – метилочипы (внешние данные) и бисульфитное секвенирование ДНК (настоящая работа), а также существенной клеточной гетерогенности АСБ.

Выявление дифференциально метилированных CpG-сайтов в генах микроРНК и их регуляторных элементах в зависимости от степени нестабильности атеросклеротических бляшек сонных артерий с помощью метилочипов Illumina

Для анализа связи уровня метилирования CpG-сайтов широкого спектра генов микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от степени их нестабильности с учетом клеточного состава были использованы данные, загруженные из электронного хранилища Gene Expression Omnibus (GSE149759).

Li Jingjin с соавт. (2021) проанализировали на микрочипах Infinium Methylation 450K и MethylationEPIC BeadChip (он же Methylation850 Beadchip) метилирование ДНК в образцах нестабильных ($n=6$) и стабильных атеросклеротических бляшек сонных артерий (АСБ) ($n=8$), а также контрольных образцов тканей левой внутренней грудной артерии (ВГА, $n=4$), которая практически никогда не поражается атеросклерозом [Li J. et al., 2021]. Важным аспектом данной работы был учет как клинической нестабильности АСБ – острое сосудистое событие (транзиторная ишемическая атака или инсульт) в течение 6 мес. до операции, так и гистологический анализ образцов – «уязвимые» или нестабильные АСБ имели кристаллы холестерина, а стабильные – выраженный фиброз (фиброатерома). Между тремя группами сравнения были выявлены дифференциально метилированные CpG-сайты (ДМС), также при

анализе данных проводилась биоинформатическая деконволюция тканей сосудов и вводилась поправка на их клеточный состав. Следует отметить, что клеточный состав артерий играет существенную роль при формировании нестабильности АСБ: ДМС не выявлено при сравнении нестабильных и стабильных АСБ при введении поправки на клеточный состав.

При сравнении ДМС генов микроРНК и/или их регуляторных элементов между АСБ сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными ВГА выделено 44 общих CpG-сайта. Большая часть этих CpG-сайтов (37-84%) гипометилирована в нестабильных АСБ по сравнению как со стабильными АСБ, так и с интактными ВГА (Рисунок 4). По три гипометилированных CpG-сайта обнаружено в локусах *NUP210L* (miR-5698; miR-190b), *RGS22* (miR-1273a), а также в локусе, включающем ген *AOPEP* (*C9orf3*) и промоторы *MIR23B* и *MIR3074* (miR-23b/27b/24-1) в нестабильных АСБ по сравнению с интактными ВГА при учете клеточного состава.

Далее для мишеней микроРНК, в «телах» и/или регуляторных элементах которых выявлены 44 ДМС между АСБ и ВГА, был проведен анализ функционального обогащения. На первом этапе анализа в базе данных miRTarBase выявлено 204 мишени, подтвержденных с высоким уровнем доказательности минимум в 2 публикациях. На втором этапе проведена функциональная аннотация белковых продуктов 204 мишеней микроРНК с помощью онлайн-инструментов Metascape и DIANA-miRPath v4.0. По результатам анализа наиболее представленными оказались биологические процессы, согласно классификатору Gene Ontology (GO) относящиеся к таким категориям как регуляция биологических процессов (GO:0065007), процессы развития (GO:0032502), ответ на эндогенные стимулы (GO:0009719), а также группа процессов регуляции транскрипции (отрицательная регуляция транскрипции РНК-полимеразой II, GO:0000122; положительная регуляция транскрипции РНК-полимеразой II, GO:0045944; положительная регуляция транскрипции, опосредованная ДНК, GO:0006355) и фосфорилирования белка (фосфорилирование белка, GO:0006468; фосфорилирование, GO:0016310; фосфорилирование пептидил-серина, GO:0018105).

Согласно базе данных KEGG, наиболее значимыми молекулярными путями для мишеней микроРНК были пути при раке (*hsa05200*, *map05200*), микроРНК при раке (*hsa05206*), сигнальный путь AGE-RAGE при осложнениях диабета (*hsa049330*), липиды и атеросклероз (*hsa05417*), сигнальный путь MAPK (*hsa04010*), а также убиквитин-опосредованный протеолиз (*map04120*), сигнальный путь PI3K-Akt (*map04151*) и фокальная адгезия (*map04510*). Обогащение некоторых из этих путей (*hsa05200*, *hsa05206*, *hsa04933*, *hsa04010*, GO:0006484) ранее было показано в исследовании дифференциальной экспрессии микроРНК между нестабильными АСБ (n=3) и стабильными АСБ сонных артерий (n=3) [Deng Y. et al., 2023].

Также одним из наиболее представленных путей был *hsa04115* (p53 signaling pathway), в то время как в данном диссертационном исследовании выявлено, что четыре микроРНК (miR-29b-2, -29c, -125b-1 и miR-155) взаимодействуют с транскрипционным фактором p53, вовлеченным в ремоделирование сосудов, а также в осложненное течение атеросклеротического поражения артерий [Chan G.H. et al., 2022].

Анализ зависимости экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий от уровня метилирования анализируемых CpG-сайтов в генах и регуляторных элементах микроРНК

Отдельные CpG-сайты в «телах» и/или регуляторных элементах генов микроРНК могут представлять собой т.н. локусы количественных признаков метилирования, связанные с экспрессией близрасположенных микроРНК (англ. *cis-expression quantitative trait methylation*, *cis-miR-eQTM*s). Изменение уровня метилирования таких локусов приводит к изменению уровня экспрессии микроРНК, что отражается на их взаимодействии с мРНК-мишенями и на продукции соответствующих белков. Чаще всего *cis-miR-eQTM* располагаются в промоторных регионах и для 60% из них показана обратная ассоциация метилирования с экспрессией близлежащей микроРНК. Однако для метилирования CpG-сайтов, приходящихся на области «тела» генов микроРНК, напротив, показана активация транскрипции при повышении уровня метилирования ДНК. Для отдельных CpG-сайтов ассоциации уровня метилирования сохранялась и при учёте экспрессии гена-хозяина микроРНК [Huan T. et al., 2020].

В дальнейший анализ вошли: а) микроРНК, рассмотренные в качестве кандидатных для анализа регуляторных элементов – miR-10b, miR-21, miR-100, miR-127 и miR-143/145; б) микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых были выявлены ДМС между атеросклеротическими бляшками сонных артерий (нестабильные, стабильные) и интактными внутренними грудными артериями – кластер miR-23b/27b/24-1, miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1, miR-155, miR-377.

На заключительном этапе работы уровень метилирования 44 CpG-сайтов, аннотированных на микрочипах Illumina (36 CpG-сайтов для кандидатных микроРНК и 8 CpG-сайтов для микроРНК, содержащих ДМС), был сопоставлен с экспрессией 23 зрелых микроРНК. Анализ проведён в одних и тех же АСБ сонных артерий (n=14), с помощью метилочипа Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina) и секвенирования зрелых микроРНК (miRNA-seq). В результате, для метилирования 8 CpG-сайтов и экспрессии 6 зрелых микроРНК установлена обратная корреляция, но между метилированием трёх CpG-сайтов и экспрессией miR-143-3p и/или miR-145-3p показана сильная прямая корреляция (Таблица 1).

Таблица 1. Значимые корреляции между метилированием CpG-сайтов генов микроРНК, аннотированных на микрочипе Infinium HumanMethylation450 BeadChip, и экспрессией микроРНК

Расположение в гене	CpG-сайт (Illumina ID)	микроРНК	Расстояние до микроРНК*	<i>rho</i> Спирмена	<i>p</i> (FDR)
промотор [#] <i>MIR10B</i>	cg27160395	miR-10b-3p	-82	-0,656	0,011
		miR-10b-5p		-0,653	0,014
<i>АОРЕР (C9orf3), MIR23B[#], MIR3074[#]</i>	cg20355301	miR-23b-3p	618	-0,600	0,026
		miR-27b-3p	381	-0,749	0,003
	cg09951047	miR-23b-3p	816	-0,701	0,007
		miR-24-1-5p	3	-0,538	0,049
		miR-27b-3p	579	-0,807	<0,001
	cg13972491	miR-23b-3p	1 246	-0,723	0,005
		miR-27b-3p	1 009	-0,837	<0,001
промотор [#] <i>MIR143HG (CARMN)</i>	cg01726320	miR-143-3p	-22 152	-0,569	0,037
		miR-145-3p	-23 880	-0,705	0,006
	cg01558401	miR-143-3p	-22 104	-0,622	0,020
		miR-145-3p	-23 832	-0,749	0,003
1й экзон <i>MIR143HG (CARMN)</i>	cg26585864	miR-143-3p	-21 963	-0,622	0,020
		miR-145-3p	-23 691	-0,749	0,003
3й интрон <i>MIR143HG (CARMN)</i> , промотор [#] <i>MIR143</i>	cg04317047	miR-145-3p	-1 821	0,679	0,010
4й экзон <i>MIR143HG (CARMN)</i> , промотор [#] <i>MIR143</i>	cg16684117	miR-143-3p	-25	0,569	0,037
		miR-145-3p	-1 753	0,692	0,008
	cg21242144	miR-143-3p	6	0,631	0,018
		miR-145-3p	-1 722	0,811	<0,001

Примечание. * – расстояние до первого нуклеотида гена микроРНК, для которой показана корреляция экспрессии с метилированием соответствующего гена; отрицательное число указывает расположение CpG-сайта в 5'-направлении, положительное – в 3'-направлении; # обозначает расположение CpG-сайта в пределах промоторного региона указанного гена микроРНК (промотор определяется как регион в пределах 3 тыс.п.н. в 5'-направлении и 500 п.н. в 3'-направлении от точка старта транскрипции гена микроРНК, CpG-берег – область в ± 2 тыс.п.н. от CpG-островка).

Положительная корреляция с уровнем экспрессии микроРНК miR-145-3p и/или miR-143-3p наблюдается для CpG-сайтов, расположенных в «теле» гена *MIR143HG* (*CARMN*) (Таблица 1). Это отчасти согласуется с литературными данными о положительной связи метилирования CpG-сайтов, приходящихся на области «тела» генов микроРНК и экспрессии этих микроРНК в цельной крови [Huan T. et al., 2020]. В то же время, следует подчеркнуть, что о данной закономерности можно говорить только в отношении гена-хозяина, *MIR143HG* (экспрессия которого, по некоторым данным, осуществляется с того же промотора, что и *MIR143*), в то время как для самих генов *MIR143* и *MIR145* нет явной взаимосвязи между дистанцией от дифференциально метилированного CpG-сайта до собственно гена микроРНК. Частично подтверждается в данном случае и наблюдение Huan с соавт. (2020) о преимущественном расположении CpG-сайтов, изменение уровня метилирования которых влияет на экспрессию генов, в 5'-направлении от гена микроРНК: большая часть (8 из 11) CpG-сайтов, прямо либо обратно коррелирующих с экспрессией микроРНК располагались в именно в 5'-направлении. Однако интересно отметить, что все три сайта, обратно коррелирующие с уровнем экспрессии miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p, располагались в 3'-направлении от соответствующих генов (Таблица 1).

Для каждой из 7 микроРНК (miR-10b-3p, miR-10b-5p, miR-143-3p, miR-145-3p, miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p), потенциально регулируемых через изменение уровня метилирования отдельных CpG-сайтов, в трех базах данных – miRDB, TarBase v.9.0 и miRTarBase v.9.0 – был проведён поиск мишеней, экспериментально валидированных с высоким уровнем доказательности. Всего было найдено 20 мишеней, для которых был проведён анализ в веб-приложении PlaqView, а именно в наборах данных по транскриптомам единичных клеток АСБ сонных артерий под идентификаторами «Alsaigh_2020» [Alsaigh T. et al., 2022] «Pan_2020» [Pan H. et al., 2020] и «Slenders_2021» [Slenders L. et al., 2021]. Наибольший уровень экспрессии отмечен для *ABCA1* (мишень miR-10b-5p и miR-27b-3p) в тучных клетках в наборах данных «Alsaigh_2020» и «Slenders_2021», *NCOR2* (мишень miR-10b-5p) в эритроцитах – в данных «Alsaigh_2020» и в тучных клетках – в данных «Slenders_2021», а также для *KLF4* (мишень miR-10b-5p) в макрофагах в данных «Pan_2020» и в эндотелиальных клетках – в данных «Slenders_2021» (Рисунок 5).

При сравнении уровня экспрессии мишеней микроРНК в наборе данных «Alsaigh_2020» между клетками из ядра атеросклеротических бляшек и клетками из их проксимальной части, а также в наборе данных «Pan_2020» между клетками АСБ симптоматических и асимптоматических пациентов, дифференциальная экспрессия была отмечена для генов семафорина *SEMA6A* в эндотелиальных клетках и рецепторной протеин-тирозинкиназы *ROR1* в кластере гладкомышечные клетки-фибробласты (мишени miR-27b-3p) (Рисунок 6). Следует отметить, что на модельных животных показано участие оси miR-27a/b / *SEMA6A* в ангиогенезе [Urbich C. et al., 2012], в то время как *ROR1* регулирует дифференцировку миофибробластов [Chavkin N.W. et al., 2021]. Данные мишени микроРНК miR-27b-3p, для которой показана значимая корреляция экспрессии и метилирования трех CpG-сайтов (cg20355301, cg09951047 и cg13972491), могут участвовать в процессах, происходящих при формировании и нестабильности атеросклеротической бляшки.

Поскольку для микроРНК miR-10b, miR-143/145 и кластера miR-23b/-27b/-24-1, а также некоторых их мишеней, показана роль в развитии атеросклероза (про- или антиатерогенная), можно говорить о том, что изменение метилирования генов микроРНК через сеть взаимодействия микроРНК и их мишеней, способно влиять на развитие атеросклероза на различных этапах, вплоть до дестабилизации атеросклеротической бляшки. Причем наиболее перспективными для дальнейшего исследования в отношении формирования и нестабильного течения атеросклероза сонных артерий являются miR-10b-5p/*KLF4* (в макрофагах и клетках эндотелия), miR-10b-5p/*NCOR2* (в тучных клетках и эритроцитах), miR-10b-5p/*ABCA1* и miR-27b-3p/*ABCA1* (в тучных клетках), а также miR-27b-3p/*SEMA6A* (в клетках эндотелия) и miR-27b-3p/*ROR1* (в гладкомышечных клетках и фибробластах).

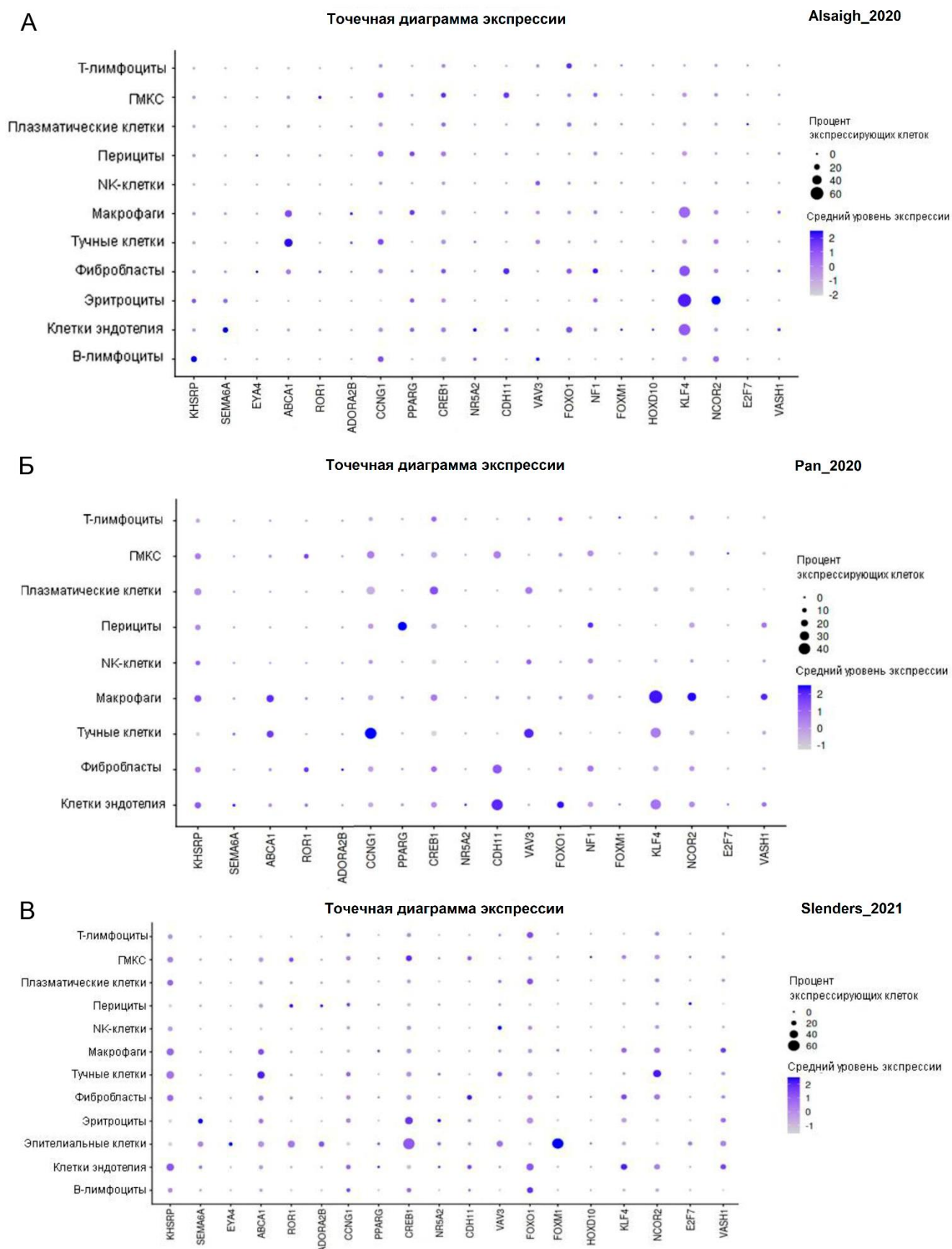


Рисунок 5. Точечные диаграммы экспрессии общих мишеней микроРНК с высоким уровнем экспрессии в наборах данных под идентификаторами «Alsaigh_2020» [Alsaigh T. et al., 2022] (А), «Pan_2020» [Pan H. et al., 2020] (Б) и «Slenders_2021» [Slenders L. et al., 2021] (В) в веб-приложении PlaqView.

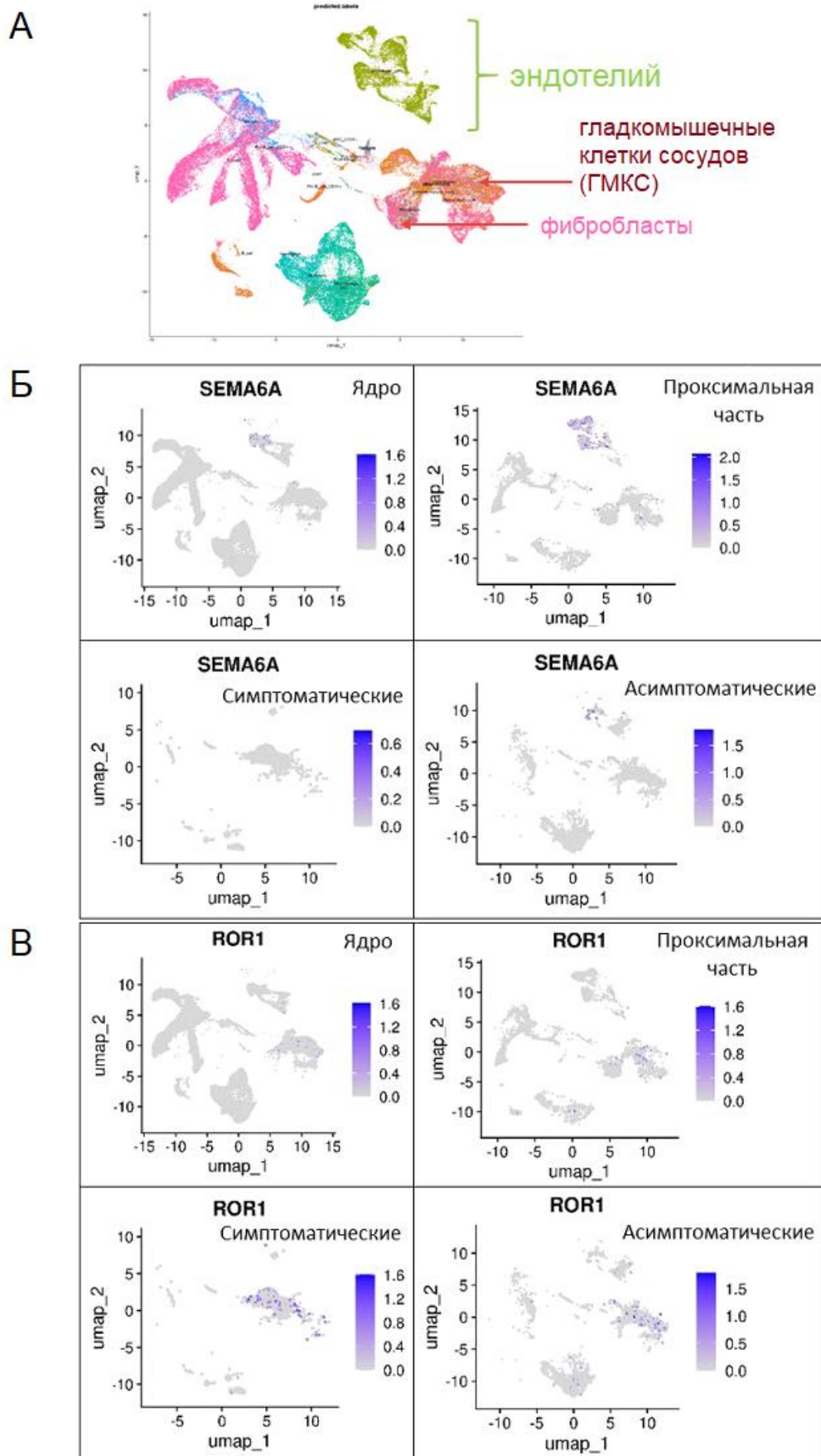


Рисунок 6. Кластеризация клеток атеросклеротических бляшек сонных артерий (А) и экспрессия генов *SEMA6A* (Б) и *ROR1* (В) в наборах данных под идентификаторами «Alsaigh_2020» [Alsaigh T. et al., 2022] и «Pan_2020» [Pan H. et al., 2020] в веб-приложении PlaqView.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение экспрессии генов микроРНК при атеросклерозе, контролируемое, в том числе, посредством метилирования в области генов микроРНК, вносит вклад в регуляцию многих генов-мишеней и прогрессии заболевания, вплоть до дестабилизации атеросклеротической бляшки. Вместе с тем, работы по изучению изменения уровня метилирования генов микроРНК либо их регуляторных элементов в нестабильных атеросклеротических бляшках сонных артерий у человека ранее не проводились. В связи с этим, цель данного диссертационного исследования заключалась в характеристике уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов при формировании и нестабильном течении клинически выраженного атеросклероза сонных артерий.

В результате выполнения диссертационного исследования подтверждена тканеспецифичность метилирования ДНК в области регуляторных элементов и «тел» генов микроРНК (*MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143*) в тканях сосудов (сонные артерии, большие подкожные вены) и лейкоцитах периферической крови (пациенты с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и относительно здоровые индивиды). Выявленный профиль метилирования анализируемых регионов в целом согласуется с данными микрочиповых исследований (GSE66500, GSE46401, GSE149759, GSE69138, GSE107143, GSE62867) по метилированию ДНК в стенках кровеносных сосудов различных русел и цельной крови.

Обнаружено, что сочетание у пациента атеросклероза сонных артерий и метаболического синдрома ассоциировано с изменением уровня метилирования регуляторного элемента E-box гена *MIR100* в клетках атеросклеротической бляшки. Выявленная взаимосвязь согласуется с имеющимися данными о снижении экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках с большим содержанием липидов и макрофагов [Pankratz F. et al., 2018], а также в крови и жировой ткани (подкожной и висцеральной) пациентов с ожирением [Pek S.L. et al., 2016].

В работе установлена связь атеросклеротического поражения и нестабильного состояния атеросклеротической бляшки с гипометилированием регуляторных элементов и «тела» генов широкого спектра генов микроРНК в клетках сонных артерий. В результате выполнения данного исследования подчеркнута ключевая роль измененного клеточного состава сосудов в отношении анализа уровня метилирования в области генов микроРНК и их регуляторных элементов при нестабильности атеросклеротического поражения сонных артерий.

Идентифицированы кандидатные гены микроРНК, изменение уровня метилирования которых происходит при формировании гистологической и клинической нестабильности атеросклеротической бляшки сонных артерий. Установлено, что в клетках атеросклеротических бляшек при их нестабильности дифференциальное метилирование затрагивает гены микроРНК, которые взаимодействуют с транскрипционным фактором клеточного цикла p53. Мишени эпигенетически регулируемых микроРНК вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: процессы развития (в т.ч. программируемая клеточная гибель), транскрипция, ответ на эндогенные стимулы, фосфорилирование белка, метаболизм липидов, организация внеклеточного матрикса и фокальная адгезия. Полученные результаты дополняют имеющиеся данные о биологических процессах и сигнальных путях, значимых при изменении экспрессии микроРНК в процессе формирования нестабильности атеросклеротической бляшки сонных артерий.

Проведенное исследование представляет собой важный этап на пути к более полному пониманию регуляции экспрессии микроРНК с помощью метилирования ДНК в клетках органов-мишеней при патологическом процессе на примере сонных артерий при их поражении атеросклерозом. Работа подчеркивает неоднозначную связь уровня метилирования генов и экспрессии микроРНК в клетках атеросклеротической бляшки. Идентифицированы cis-miR-eQTMс, которые в промоторах генов микроРНК отрицательно коррелируют с экспрессией зрелых микроРНК. Однако метилирование CpG-сайтов в области «тела» гена-хозяина микроРНК, наоборот, положительно коррелирует с их экспрессией в клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий.

Наконец, в результате настоящего исследования, принимая во внимание данные по валидированным мишеням эпигенетически регулируемых микроРНК и транскриптомам

единичных клеток сонных артерий у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом, обозначены регуляторные оси miR-10b-5p/KLF4 (в макрофагах и клетках эндотелия), miR-10b-5p/NCOR2 (в тучных клетках и эритроцитах), miR-10b-5p/ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1 (в тучных клетках), а также miR-27b-3p/SEMA6A (в клетках эндотелия) и miR-27b-3p/ROR1 (в гладкомышечных клетках и фибробластах), которые могут быть значимы в отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий.

ВЫВОДЫ

1. У пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий уровень метилирования в области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR21*, *MIR100*, *MIR127* и *MIR143* различается между лейкоцитами периферической крови и тканями сосудов (сонных артерий, больших подкожных вен).
2. Атеросклеротическое поражение сонных артерий преимущественно характеризуется умеренным гипометилированием в промоторе и «теле» генов *MIR10B* и *MIR143*, CpG-островка и «тела» *MIR21*, а также E-box элемента *MIR100* по сравнению с интактными сосудами. Показано, что сочетание у пациента атеросклероза сонных артерий и метаболического синдрома ассоциировано с увеличением уровня метилирования E-box элемента гена *MIR100* в клетках атеросклеротической бляшки.
3. Уровень метилирования CpG-сайтов в промоторном регионе гена *MIR21*, а также в области CpG-островков генов *MIR10B* и *MIR127* разнонаправленно ассоциирован с отдельными параметрами гистологической нестабильности атеросклеротической бляшки сонной артерии (наличием тромботических масс, кровоизлияний, разрывом, кальцификатами, толщиной покрышки бляшки, размером ядра, количеством воспалительных и пенистых клеток). Выявлено умеренное увеличение уровня метилирования CpG-островка гена *MIR127* в клетках атеросклеротической бляшки у пациентов с наличием ОНМК в анамнезе.
4. В лейкоцитах периферической крови пациентов установлена разнонаправленная корреляция с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий и его патогенетически значимыми признаками (возрастом, показателями липидного обмена, уровнем глюкозы в крови и степенью стеноза сонных артерий) для уровня метилирования CpG-сайтов области регуляторных элементов и «тел» генов *MIR10B*, *MIR143* и *MIR127*.
5. Выявлено, что клинически и гистологически нестабильные атеросклеротические бляшки сонных артерий имеют больший процент гипометилированных CpG-сайтов в области генов микроРНК и их регуляторных элементов по сравнению с интактными артериями. При сравнении нестабильных и стабильных атеросклеротических бляшек с учетом поправки на клеточный состав дифференциально метилированных CpG-сайтов не обнаружено.
6. Анализ функционального обогащения микроРНК, в генах и/или регуляторных элементах которых были выявлены дифференциально метилированные сайты, ассоциированные с нестабильностью атеросклеротических бляшек, показал, что miR-29b-2, miR-29c, miR-125b-1 и miR-155 взаимодействуют с транскрипционным фактором p53. Мишени данных эпигенетически регулируемых микроРНК вовлечены в широкий спектр биологических процессов и сигнальных путей: процессы развития (в том числе программируемая клеточная гибель), транскрипция, ответ на эндогенные стимулы, фосфорилирование белка, метаболизм липидов, организация внеклеточного матрикса и фокальная адгезия.
7. В клетках атеросклеротических бляшек сонных артерий в промоторах генов *MIR10B*, *MIR143*, *MIR143HG* (*CARMN*) и *MIR23B* выявлены cis-miR-eQTMс с высокой отрицательной корреляцией уровня метилирования ДНК и экспрессии ближайших микроРНК (miR-10b-3p, miR-10b-5p, miR-143-3p, miR-145-3p, miR-23b-3p, miR-27b-3p и miR-24-1-5p). Большой уровень метилирования в CpG-сайтах «тела» гена *MIR143HG* (*CARMN*) ассоциирован, наоборот, с увеличением экспрессии miR-145-3p и miR-143-3p. В отношении формирования и нестабильного течения атеросклеротического поражения сонных артерий значимыми являются регуляторные оси: miR-10b-5p/KLF4, miR-10b-5p/NCOR2, miR-10b-5p/ABCA1 и miR-27b-3p/ABCA1, а также miR-27b-3p/SEMA6A и miR-27b-3p/ROR1.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК:

1. **Королёва Ю.А.**, Зарубин А.А., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Муслимова Э.Ф., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования предполагаемого регуляторного региона гена *MIR100* при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования // Медицинская генетика. – 2023. – Т. 22. – № 1. – С. 43-46. **RCSI**
2. Гончарова И.А., **Королева Ю.А.**, Слепцов А.А., Бабушкина Н.П., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Связь локуса 17q23.1 с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий // Медицинская генетика. – 2021. – Т. 20. – № 10. – С. 25-32. **RCSI**
3. **Королёва Ю.А.**, Марков А.В., Слепцов А.А., Зарубин А.А., Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования гена *MIR21* в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования // Медицинская генетика. – 2020 – Т. 19. – № 5. – С. 41-43. **RCSI**
4. Марков А.В., Бабушкина Н.П., Голубенко М.В., Салахов Р.Р., Зарубин А.А., Слепцов А.А., **Королёва Ю.А.**, Шарыш Д.В., Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Особенности метилирования CpG-сайтов в области гена микроРНК *MIR10B* и гена транскрипционного фактора *TWIST1* при атеросклерозе // Медицинская генетика. – 2020 – Т. 19. – № 5. – С. 44-45. **RCSI**
5. **Королева Ю.А.**, Зарубин А.А., Марков А.В., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Назаренко М.С. Анализ связи уровня метилирования генов *MIR10B* и *MIR21* в лейкоцитах крови с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). – 2018 – Т. 33. – № 2. – С. 77-82. **Scopus**
6. Назаренко М.С., Марков А.В., **Королева Ю.А.**, Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Идентификация дифференциально метилированных генов, потенциально связанных с атеросклерозом у человека // Российский кардиологический журнал. – 2017 – Т. 10. – № 150. – С. 42-48. **Scopus**
7. Марков А.В., Назаренко М.С., **Королёва Ю.А.**, Лебедев И.Н., Слепцов А.А., Фролов А.В., Барбараш О.Л., Барбараш Л.С., Пузырев В.П. Уровень метилирования промоторного региона гена *HOXD4* у больных атеросклерозом // Медицинская генетика. – 2014 – Т. 13. – № 139. – С. 39-42. **RCSI**

Статьи в сборниках и материалах конференций:

1. **Королёва Ю.А.** Метилирование предполагаемых промоторов и генов *MIR21* и *MIR143* при нестабильном атеросклерозе сонных артерий // В сборнике материалов Четвертого Всероссийского научно-образовательного форума с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал: материалы». – Томск, 2023. – С. 309.
2. **Королёва Ю.А.**, Зарубин А.А., Бабушкина Н.П., Гомбоева Д.Е., Кузнецов М.С., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования гена *MIR127* при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». – Томск, 2022. – С. 46-50.
3. Goncharova I.A., **Koroleva I.A.**, Markov A.V., Sleptcov A.A., Nazarenko M.S. Association of rs8078424 with carotid atherosclerosis and functional activity of miR21 gene // Atherosclerosis. – 2021. – V. 331. – P. E103. (Abstracts from 89th Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS) Helsinki, Finland, May 30- June 02, 2021)
4. **Королёва Ю.А.**, Марков А.В., Слепцов А.А., Зарубин А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования предполагаемого промоторного региона гена *MIR21* у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». – Томск, 2020. – С. 37-41.
5. **Королёва Ю.А.**, Салахов Р.Р., Марков А.В., Шарыш Д.В., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Бурков Н.Н., Пузырев В.П., Назаренко М.С. Вариабельность метилирования генов *MIR21* и *MIR143HG* (*CARMN*) при осложненном течении атеросклероза // В сборнике научных трудов «Генетика человека и патология: актуальные проблемы клинической и молекулярной цитогенетики». Вып. 12. – Томск, 2019. – С. 31-32.

6. Дампилова Т.Д., Шарыш Д.В., Марков А.В., **Королева Ю.А.**, Слепцов А.А., Зарубин А.А., 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 гена микроРНК *MIR127* в клетках сонных артерий и крови пациентов с атеросклерозом // В сборнике тезисов VI Международной конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов. – Кольцово, 2019. – С. 466-470.
7. Nazarenko M., Sleptcov A., Markov A., **Koroleva I.**, Zarubin A., Sharysh D., Valiahmetov N., Kazantsev A., Burkov N., Barbarash O., Puzyrev V. The integrative approach for identification of new molecular targets of human advanced atherosclerosis // *Atherosclerosis*. – 2019. – V. 287. – P. E70-71. (Abstracts from 87th Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS) Maastricht, Netherlands, May 26-29, 2019)
8. **Королёва Ю.А.**, Зарубин А.А., Марков А.В., Салахов Р.Р., Шарыш Д.В., Слепцов А.А., Казанцев А.Н., Бурков Н.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П., Назаренко М.С. Взаимосвязь уровня метилирования промоторных регионов генов *MIR21* и *MIR143HG (CARMN)* при атеросклерозе // В сборнике тезисов Международного Конгресса «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». – Санкт-Петербург, 2019. – С. 982.
9. **Koroleva I.**, Nazarenko M., Markov A., Kazantsev A., Barbarash O., Puzyrev V. The methylation level of *MIR10B* and *MIR21* genes promoters in carotid atherosclerosis // *Atherosclerosis*. – 2018. – V. 275. – P. E189. (Abstracts from 86th Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS) Lisbon, Portugal, May 05-08, 2018).
10. **Королёва Ю.А.**, Зарубин А.А., Назаренко М.С. Перспективы использования регуляторных РНК в диагностике сердечно-сосудистых заболеваний // В сборнике «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике». Вып. 27. – Новосибирск, 2018. – С. 71-83.
11. **Королёва Ю.А.**, Зарубин А.А., Марков А.В., Назаренко М.С. Связь уровня метилирования промотора гена *MIR21* с патогенетически значимыми признаками атеросклероза сонных артерий // В сборнике Российского национального конгресса кардиологов. – Москва, 2018. – С. 273
12. **Королёва Ю.А.**, Марков А.В., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Назаренко М.С. Анализ связи уровня метилирования промоторов генов *MIR10B* и *MIR21* с нестабильностью атеросклеротических бляшек сонных артерий // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». – Томск, 2018. – С. 105-107.
13. Марков А.В., Назаренко М.С., Кучер А.Н., **Королева Ю.А.**, Зарубин А.А., Шарыш Д.В., Барбараш О.Л., Пузырёв В.П. Связь метилирования генов микроРНК со стабильностью атеросклеротической бляшки // В сборнике материалов конгресса молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины». – Томск, 2018. – С. 111-113.
14. 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. – Vol. 275. – P. E188-189. (Abstracts from 86th Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS) Lisbon, Portugal, May 05-08, 2018)
15. Markov A.V., **Koroleva I.A.**, Kucher A.N., Nazarenko M.S., Barbarash O.L., Puzyrev V.P. DNA methylation within microRNA gene *MIR10B* in atherosclerosis // Abstracts from the 50th European Society of Human Genetics Conference. *European Journal of Human Genetics*. – 2018. – Vol. 26. – P. 259.
16. 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 // Abstracts from The 11th International Conference Systems biology and biomedicine (SBIOMED-2018). – / Novosibirsk, 2018. – P. 88.
17. Markov A., **Koroleva I.**, Kucher A., Nazarenko M. DNA methylation within microRNA genes in vessels and leukocytes of patients with atherosclerosis // *Atherosclerosis*. – 2017. – V. 263. – P. E280 (Abstracts from the 85th Congress of the European-Atherosclerosis-Society (EAS), Prague, Czech Republic, Apr 23-26, 2017)
18. Назаренко М.С., Марков А.В., Слепцов А.А., **Королева Ю.А.**, Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Молекулярное профилирование тканей при атеросклерозе // В сборнике «Молекулярная диагностика 2017». – 2017. – С. 132-133.
19. **Королёва Ю.А.**, Назаренко М.С., Марков А.В., Казанцев А.Н., Барбараш О.Л. Анализ уровня метилирования в области промоторов генов *MIR10B* и *MIR21* при клинически выраженном атеросклерозе сонных артерий // В сборнике «Генетика человека и патология». Вып. 11. – С. 81-82.

20. **Королёва Ю.А.**, Марков А.В., Назаренко М.С. Анализ уровня метилирования гена *MIR10B* при атеросклерозе методом бисульфитного пиросеквенирования // Клинико-лабораторный консилиум. – 2017. – Т. 1. – № 53. – С. 48.
21. Назаренко М.С., Слепцов А.А., Марков А.В., **Королёва Ю.А.**, Казанцев А.Н., Барбараш О.Л., Пузырев В.П. Структурная и эпигенетическая вариабельность генома клеток сосудов и лейкоцитов при атеросклеротическом поражении артерий // В сборнике «Генетика человека и патология». Вып. 11. – 2017. – С. 89-90.
22. **Королёва Ю.А.**, Назаренко М.С. Роль метилирования генов микроРНК *MIR10B*, *MIR21* и *MIR155* в патологии человека // В сборнике «Молекулярно-биологические технологии в медицинской практике». Вып. 26. – Новосибирск, 2017. – С. 95-106.
23. Марков А.В., Кучер А.Н., Назаренко М.С., **Королёва Ю.А.**, Пузырев В.П. Метилирование CpG-сайтов генов микро-РНК в тканях стенки сосудов и лейкоцитах крови человека // В сборнике «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы» – 2016. – С. 218.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

cis-miR-eQTM – (англ. cis-miR-expression quantitative trait methylation) – локусы количественных признаков метилирования, связанные с экспрессией близрасположенных микроРНК

CpG – (англ. cytosine-phosphate-guanine) – динуклеотид цитозин-гуанин

FDR – (англ. False Discovery Rate) – вероятность ложноположительного результата

miR – (англ. miRNA, microRNA) – микроРНК

АСБ – атеросклеротическая бляшка сонной артерии

ВГА – внутренняя грудная артерия

ДМС – дифференциально метилированные CpG-сайты

ЛПК – лейкоциты периферической венозной крови

ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения

п.н. – пар нуклеотидов

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
д-ру мед. наук Назаренко М.С.
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru