

ГЕНОМИКА.
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.21+616.13.002.2-004.6

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ
ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ В ГЕНАХ микроРНК
ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ СОННЫХ АРТЕРИЙ

© 2023 г. А. А. Зарубин^а, К. В. Маннанова^б, Ю. А. Королёва^а, А. А. Слепцов^а, М. С. Кузнецов^с,
Б. Н. Козлов^с, М. С. Назаренко^{а, б, *}

^аНаучно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук, Томск, 634050 Россия

^бСибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Томск, 634050 Россия

^сНаучно-исследовательский институт кардиологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук, Томск, 634034 Россия

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

Поступила в редакцию 19.07.2022 г.

После доработки 05.10.2022 г.

Принята к публикации 05.10.2022 г.

МикроРНК, участвующие в регуляции экспрессии генов, вовлечены в патогенез широкого спектра многофакторных заболеваний, в том числе атеросклероза, его факторов риска и осложнений, что делает актуальным изучение функционально значимых полиморфных вариантов в генах микроРНК у пациентов с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. Нами проведено секвенирование экзомов и микроРНК из одних и тех же образцов атеросклеротических бляшек сонных артерий мужчин ($n = 8$, возраст 66–71 лет) с клинически выраженным атеросклерозом. В подтверждающем исследовании использовали расширенную выборку из 112 пациентов и 72 индивидов контрольной группы (этнических славян, жителей Западной Сибири). В образцах сонных артерий, пораженных атеросклерозом, обнаружены 206 пре-микроРНК и 76 зрелых микроРНК, содержащих 321 и 97 однонуклеотидных вариантов (SNV) соответственно. Объединение данных секвенирования экзомов и микроРНК показало, что 18 генов микроРНК, которые экспрессируются в атеросклеротических бляшках до зрелого состояния, несут 24 SNV. Из них наибольшей потенциальной функциональной значимостью в отношении экспрессии микроРНК, предсказанной *in silico*, обладали варианты rs2910164:C>G (*MIR146A*), rs2682818:A>C (*MIR618*), rs3746444:A>G (*MIR499A*), rs776722712:C>T (*MIR186*) и rs199822597:G>A (*MIR363*). В образцах, полученных от пациентов с генотипом AC rs2682818 гена *MIR618*, выявлено снижение уровня экспрессии miR-618 по сравнению с генотипом CC ($\log_2FC = 4.8$; $p = 0.012$). Обнаружено, что rs2910164:C (*MIR146A*) ассоциирован с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий (OR = 2.35; 95%CI: 1.43–3.85; $p = 0.001$). Интегративный подход позволил выявить новые наиболее информативные с точки зрения предсказания функциональной значимости полиморфные варианты в генах микроРНК. Вариант rs2682818:A>C (*MIR618*) может быть связан с изменением экспрессии miR-618 в атеросклеротических бляшках сонных артерий, а rs2910164:C (*MIR146A*) ассоциирован с риском развития клинически выраженного атеросклероза.

Ключевые слова: микроРНК, секвенирование, атеросклероз сонных артерий

DOI: 10.31857/S0026898423030205, **EDN:** CHZTLI

ВВЕДЕНИЕ

Атеросклеротическое поражение сонных артерий часто приводит к развитию таких осложнений, как хроническая ишемия головного мозга, сосудистая деменция, транзиторная ишемическая атака и ишемический инсульт [1]. На сегодняшний день значительно улучшилось понимание патофизиологических процессов, лежащих в основе формирования атеросклероза и механиз-

мов его клинических осложнений, открыты ключевые сигнальные пути и молекулы, участвующие в инициации и прогрессии атеросклеротических бляшек [2].

Среди таких молекул особый интерес представляют микроРНК – малые (miRNA; в среднем 22 нуклеотида) одноцепочечные некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов в ядре на уровне транскрипции и на посттран-

скрипционном уровне в цитоплазме, связываясь с 3'-нетранслируемой областью мРНК. Связывание может быть как полностью комплементарным с деградацией мРНК гена-мишени, так и частично комплементарным (более характерно для микроРНК) с подавлением трансляции [3]. При частичной комплементарности одна микроРНК может иметь сразу несколько сотен мРНК-мишеней. Верно и обратное — одна мРНК может связываться с разными микроРНК.

Полиморфизм в генах микроРНК (в регуляторных участках, в при- и пре-микроРНК, в области нуклеотидной последовательности зрелой микроРНК), а также в генах их биогенеза и генах-мишенях может быть функционально значимым для формирования атеросклероза и его осложненного течения [4]. Варианты в генах микроРНК могут влиять на процессинг и уровень экспрессии соответствующих молекул, на их биогенез, активность, а также на взаимодействие зрелой микроРНК с ее мРНК-мишенью [5]. Однако нуклеотидная вариабельность в области генов (при/пре-) микроРНК при сердечно-сосудистых заболеваниях изучена недостаточно детально [5, 6].

Многочисленные исследования показывают, что микроРНК участвуют почти во всех этапах атерогенеза, способствуя или подавляя данный патологический процесс [7–9]. В базе данных HMDD v3.0: the Human microRNA Disease Database (обновление от 27 марта 2019 г.) содержится информация о 116 экспериментально подтвержденных микроРНК, связанных с атеросклерозом, из них 26 микроРНК ассоциированы с атеросклерозом сонных артерий и 67 — с ишемическим инсультом [10].

В большинстве работ, направленных на поиск ассоциаций полиморфных вариантов генов микроРНК (miR-let-7, miR-27a, -146a, -149, -196a2, -200b, -423, -499, -618, -4513) с клиническими осложнениями атеросклероза, анализировали преимущественно отдельные однонуклеотидные варианты (SNV) в популяциях Азии и получали противоречивые результаты [11–16].

В других работах изменение экспрессии микроРНК в клетках сосудов, пораженных атеросклерозом, анализировали с использованием различных групп сравнения и методов, включая ПЦР в режиме реального времени и технологии микрочипов [17, 18]. В результате идентифицирована 31 микроРНК (miR-1, let-7f, -9, -10a, -10b, -16, -19a, -19b, -21, -22, -24, -25, -29b, -29c, -34a, -92a, -100, -106b, -125a, -127, -133a, -133b, -143, -145, -146a, -150, -155, -221, -223, -486 и -497), экспрессия которых в атеросклеротических бляшках коронарных и сонных артерий статистически значимо отличается от экспрессии в интактных тканях сосудов, либо в нестабильных (симптоматических) и стабильных (асимптоматических) атеросклеро-

тических бляшках в двух или более исследованиях [19]. Однако вплоть до настоящего времени нет работ, в которых анализируется вариабельность генов микроРНК и экспрессия микроРНК в атеросклеротических бляшках у одних и тех же пациентов.

В связи с этим актуальным представляется исследование функционально значимых вариантов в генах микроРНК и анализ их ассоциации с заболеваниями, обусловленными атеросклерозом, в европейских популяциях. Изучение полиморфных вариантов в генах микроРНК, участвующих в патогенезе атеросклероза, поможет выявить новые молекулярные механизмы развития заболевания, а также возможные биомаркеры и мишени для таргетной терапии. Полученные данные могут быть использованы для идентификации и стратификации индивидов, прогнозирования риска развития клинических осложнений атеросклероза.

В нашей работе с помощью секвенирования экзона и микроРНК охарактеризован спектр функционально значимых однонуклеотидных полиморфных вариантов в генах микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий одних и тех же пациентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования послужили образцы пораженных атеросклерозом сонных артерий, полученные в ходе каротидной эндартерэктомии от восьми пациентов мужского пола (66–71 лет, славяне, жители Западной Сибири). Степень стеноза сонных артерий при ультразвуковом обследовании варьировала от 67 до 90%. Все пациенты курили, в анамнезе у них отмечена артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца; у двух разных пациентов было острое нарушение мозгового кровообращения (ОНМК) и инфаркт миокарда (ИМ), а еще у одного — сахарный диабет типа 2. Все пациенты принимали лекарственные препараты из групп статинов, антигипертензивных препаратов и антикоагулянтов/дезагрегантов. Биоптаты тканей сонных артерий замораживали и хранили в жидком азоте до процедуры выделения ДНК и РНК.

ДНК выделяли стандартным методом фенол-хлороформной экстракции. ДНК-библиотеки для секвенирования экзона получали с использованием SureSelect Clinical Research Exome Enrichment Kit (“Agilent”, США). Качество ДНК-библиотек оценивали с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (“Agilent”). Секвенирование проводили на приборе HiSeq 1500 (“Illumina”, США) в режиме 2 × 150 п.н. Первичные данные хранятся в репозитории NCBI BioProject, PRJNA758796 [20].

Анализ генетических вариантов проводили с использованием алгоритма Genome Analysis Toolkit (GATK) для поиска унаследованных SNV, коротких инсерций и делеций [21]. Качество прочтений оценивали с помощью программы FastQC v0.11.5 [22]. Выравнивание на сборку генома GRCh38 проводили с помощью GATK BwaSpark, поиск SNV – с использованием GATK Haplotype-Caller [21]. Из дальнейшего анализа исключали инсерции и делеции, а также однонуклеотидные варианты, аннотированные в нескольких локусах генома.

РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (“ThermoFisher”, США) и набора PureLink RNA Micro Scale Kit (“ThermoFisher”). Из всех образцов тканей сонных артерий выделена РНК хорошего качества (RINs >7.0), кроме одного образца, который исключили из дальнейшего исследования. Для приготовления библиотеки кДНК использовали набор NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (“New England Biolabs”, Великобритания). Качество библиотек оценивали с помощью прибора Bioanalyzer 2100 (“Agilent”). Секвенирование осуществляли на приборе HiSeq 1500 (“Illumina”) в режиме 1 × 50 п.н. Данные секвенирования микроРНК анализировали с использованием пакета программ miARma-Seq [23]. Качество прочтений оценивали с помощью программы FastQC v0.11.5. Для удаления адапторов и обрезки последовательностей использовали пакет программ Trim Galore [24]. Выравнивание осуществляли на сборку генома GRCh38 с помощью программного обеспечения BWA-MEM [25]. Количество прочтений микроРНК подсчитывали с использованием алгоритма featureCounts [26]. Уровни экспрессии микроРНК оценивали с использованием пакета “edgeR” в программной среде R. Идентификацию SNV в данных секвенирования микроРНК проводили с помощью пакета программ GATK [21]. Информация о предшественниках (miRNA_primary_transcript) и зрелых микроРНК (miRNA) получена из базы miRBase v22 [27]. Функциональную значимость SNV для экспрессии микроРНК предсказывали с помощью программы miRVaS [28]. Связь микроРНК с атеросклерозом и его осложнениями оценивали с использованием информации, полученной из базы данных HMDD v3.2 [29].

Для подтверждающего исследования и анализа ассоциаций полиморфизма rs2910164 гена *MIR146A* с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий у славян, жителей Западной Сибири, использовали расширенную выборку пациентов ($n = 112$, возраст 65 (59; 69) лет, 78 мужчин и 34 женщины). Степень стеноза сонных артерий при ультразвуковом исследовании (УЗИ) составила $\geq 70\%$, что стало показанием к каротидной эндартерэктомии. У всех пациентов в

анамнезе была артериальная гипертензия. Курили 68 (60.7%) пациентов, а сахарный диабет типа 2 выявлен у 2 (1.8%) пациентов. ОНМК и ИМ зарегистрированы у 38 (33.9%) пациентов, одновременно оба эти события выявлены у 10 (9%) индивидов.

Контрольная группа сформирована из относительно здоровых индивидов без сердечно-сосудистой патологии в анамнезе и признаков ишемии головного мозга при клиническом обследовании ($n = 72$, возраст 69 (67;73) лет, 45 мужчин и 26 женщин). У всех индивидов проведено УЗИ, выявившее начальные стадии атеросклероза сонных артерий, но без гемодинамически значимых изменений (стеноз не превышал 24%).

Генотипирование образцов лейкоцитов периферической крови индивидов проведено с помощью ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПЦР-ПДФ), согласно Yamashita J. и соавт. [30]. Распределение генотипов по полиморфному варианту rs2910164 гена *MIR146A* в контрольной группе не выявило отклонений от равновесия Харди–Вайнберга.

Полученные данные анализировали с помощью пакета программ R (The R Foundation). Сравнение количественных данных проводили с использованием критерия Вилкоксона, а качественных – критерия χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность и/или точного критерия Фишера. Численные значения приведены далее в формате медиана [1-квартиль, 3-квартиль]. Относительный риск у носителей ассоциированного с болезнью аллеля по полиморфному генетическому варианту оценивали по величине отношения шансов (OR), для которой рассчитывали 95%-ный доверительный интервал (95% ДИ). Пороговый уровень значимости принят равным $p = 0.05$.

Проведение работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные экзомного секвенирования ДНК, выделенной из атеросклеротических бляшек сонных артерий восьми пациентов, характеризовались 55.9 [55.0; 57.5] миллионами парноконцевых прочтений длиной 150 п.н. на образец. В нуклеотидной последовательности предшественников микроРНК найдено 380 SNV, из которых у 321 покрытие ≥ 10 выявлено хотя бы в одном образце (приходящихся на 206 генов микроРНК), из них 234 (72.9%) составили транзиции и 87 (27.1%) – трансверсии. В области нуклеотидной последовательности зрелой микроРНК выявлено 113 SNV, в

том числе с покрытием $\geq \times 10$ – 97 (76 генов), из них 75 (77.3%) транзиций и 22 (22.7%) трансверсий. Эти результаты согласуются с большей частотой транзиций в области генов микроРНК, чем замен других типов [31].

В результате высокопроизводительного секвенирования микроРНК, выделенных из атеросклеротических бляшек сонных артерий семи пациентов, получено в среднем 7.8 [7.2; 12.3] миллиона одноконцевых прочтений длиной 50 п.н., из них 467 [253; 852] тысяч приходилось на микроРНК. Экспрессия на уровне больше 10 СРМ (количество прочтений данной микроРНК на миллион прочтений в образце) хотя бы в одном образце зарегистрирована у 364 (19%) из 1917 известных микроРНК, согласно базе miRbase v.22. Причем большую часть микроРНК (169 (61%) из 278), обнаруженных в атеросклеротических бляшках без детализации -5p/-3p, ранее не связывали с атеросклерозом, в том числе сонных артерий и ишемическим инсультом, согласно базе данных HMDD v3.2. Более того, лишь 28 (8%) из 364 микроРНК с детализацией -5p/-3p или 76 (27%) из 278 микроРНК без данного уточнения ранее анализировали в качестве биомаркеров ИБС, острого коронарного синдрома, ИМ, инсульта [32].

Наиболее высокий уровень экспрессии выявлен у miR-143-3p – 18.7 [17.3; 18.9], miR-21-5p – 17.0 [16.4; 17.5] и miR-100-5p – 15.9 [15.4; 16.3]. Экспрессия этих микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий суммарно составляет 36% от экспрессии всех микроРНК, причем 23% приходилось на miR-143-3p. Эти результаты согласуются с тем, что экспрессия лишь нескольких микроРНК обуславливает существенную долю суммарного уровня микроРНК в анализируемом образце [33].

С использованием GATK проведен поиск генетических вариантов микроРНК в данных секвенирования. В результате идентифицировано 427 SNV, из которых покрытие $\geq \times 10$ хотя бы в одном образце установлено у 207 (48%), но только три SNV (1.5%) (rs4534339, rs771605638 и rs775920236) располагались в области нуклеотидной последовательности зрелой микроРНК (miR-1843 и miR-100 соответственно). Причем rs4534339 подтвержден и данными экзомного секвенирования – все пациенты имели генотип TT (частота минорного аллеля (MAF) согласно gnomAD у европейцев – 0.99).

При сопоставлении результатов экзомного секвенирования и экспрессии микроРНК выявлено 24 SNV, расположенных в 18 генах микроРНК, которые представляют интерес с точки зрения их влияния на регуляцию экспрессии соответствующих микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий (табл. 1). Из этих 24 SNV 14 (58%) были частыми, согласно базе данных gnomAD (MAF gnomAD $\geq 5\%$). Частые

варианты rs71428439 и rs2292832 расположены в области гена *MIR149*, а редкие rs796224492, rs796361602, rs796973621, rs796153424, rs878994369 и rs796405877 – в гене *MIR10527*. Потенциально наибольшей функциональной значимостью для 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*).

Выявлены пять микроРНК с наиболее высоким уровнем экспрессии в атеросклеротических бляшках сонных артерий: miR-27a-3p – 12.9 [12.0; 13.3], miR-146a-5p – 15.9 [15.4; 16.2], miR-423-5p – 12.1 [10.4; 12.3], miR-423-3p – 11.6 [10.8; 11.7] и miR-186-5p – 10.3 [9.4; 10.4] (табл. 1).

С риском развития ишемического инсульта – осложнением атеросклероза сонных артерий, ранее связывали аллель С/генотип СС rs2292832 (*MIR149*) в азиатских популяциях [34, 35], аллель G/генотип GG rs2910164 (*MIR146A*) у жителей Южной Кореи [12, 13, 36], а в популяции Китая генотипы GT+TT rs2682818 (*MIR618*) [37] и генотип GG rs3746444 (*MIR499A*; табл. 1) [13].

С увеличением риска ИБС связаны аллель Т rs2292832 (*MIR149*) в Южной Корее [38], аллель А rs6505162 (*MIR423*) в Индии [39], а в популяциях Азии – генотипы СС rs2910164 (*MIR146A*) [12, 15] и GG rs3746444 (*MIR499A*; табл. 1) [15]. Риск ИМ увеличен у носителей генотипов СС rs895819 (*MIR27A*) [40] и GG rs3746444 (*MIR499A*; табл. 1) [41]. Однако проведенный недавно метаанализ (восемь исследований, 2507 пациентов с ИМ и 3796 здоровых жителей Азии, 11 полиморфизмов генов микроРНК) показал, что, наоборот, риск ИМ повышен у носителей генотипа GG rs2910164 (*MIR146A*), а также AA+AG rs3746444 (*MIR499A*) (табл. 1) [42].

Исследования, проведенные на культурах клеток *in vitro*, показали вовлеченность miR-186-5p, miR-149-5p, miR-146a-5p, miR-182-5p, miR-27a-3p, miR-363-3p в развитие атеросклеротического поражения артерий (табл. 1) [43–50].

На рис. 1 представлен уровень экспрессии 19 микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от генотипа пациентов по SNV, расположенных в области генов микроРНК. Однако экспрессия только одной из них – miR-618 – в атеросклеротических бляшках сонных артерий пациентов с генотипом АС rs2682818 гена *MIR618* была в 27 раз ниже, чем у носителей генотипа СС ($\log_2 FC = 4.8$; $p = 0.012$; рис. 1). Полиморфизм rs2682818 может влиять на экспрессию miR-618, препятствуя формированию вторичной структуры шпильки и процессингу предшественника miR-618 до ее зрелой формы. Показано, что аллель А rs2682818 ассоциирован со снижением уровня зрелой miR-618 в клетках HeLa по сравнению с аллелем С [51]. Кроме того,

Таблица 1. Спектр и характеристика SNV в генах микроРНК, экспрессируемых в атеросклеротических бляшках сонных артерий

№	dbSNP:ref/alt	Ген микроРНК	Генотип, кол-во пациентов	Уровень экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий (n = 7)	MAF alt (gnomAD)	Локализация SNV относительно микроРНК	MFE	MFE deltaG ref/alt	Ассоциация с атеросклерозом сонных и коронарных артерий и его осложнениями (HMD, CVD)
1	rs776722712:C>T	MIR186	CC, 7; CT, 1	miR-186-5p = 10.3 [9.4; 10.4]	0.0002	mature3p/miR-186	mature	-40.6/-36.9	AT [43, 44]
2	rs4534339:C>T	MIR1843	TT, 8	miR-1843 = 5 [4.8; 5.7]	0.9397	NA	NA	NA	-
3	rs71428439:A>G	MIR149	AA, 7; AG, 1	miR-149-5p = 4.5 [4.1; 6]	0.1333	arm3p/miR-149	no change	-56.1/-56.1	ИМ [42]
4	rs2292832:T>C	MIR149	TC, 5; CC, 3	miR-149-5p = 4.5 [4.1; 6]	0.6889	arm3p/miR-149	no change	-56.1/-58.3	ИИ [34, 35], ИМ [42], AT [45]
5	rs28645567:G>A	MIR378DI	GG, 7; GA, 1	miR-378d = 3.8 [3.6; 4.4]	0.0766	arm5p/miR-378d-1	no change	-19.6/-17.3	-
6	rs2910164:C>G	MIR146A	CC, 1; CG, 2; GG, 5	miR-146a-5p = 12.1 [11.8; 12.7]	0.7018	mature3p, seed/miR-146a	seed	-38.8/-41.8	ИИ [12, 13, 36], ИБС [12, 15], ИМ [42], AT [46, 47]
7	rs7648176:C>T	MIR182	CC, 7; CT, 1	miR-182-5p = 5.9 [5.1; 7.8]	0.05786	arm3p/miR-182	arm	-47.3/-47.9	AT [48]
8	rs7911488:A>G	MIR1307	AA, 4; AG, 4	miR-1307-3p = 8.1 [7.5; 8.4]; miR-1307-5p = 6.3 [6.1; 6.7]	0.2697	loop/miR-1307	no change	-55.4/-55.4	-
9	rs17091403:C>T	MIR2110	CC, 7; CT, 1	miR-2110 = 5.9 [5.4; 6.1]	0.0751	arm5p/miR-2110	mature	-34.6/-35.4	-
10	rs796224492:T>C	MIR10527	TT, 3; TC, 5	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0467	NA	NA	NA	-
11	rs796361602:C>T	MIR10527	CC, 3; CT, 5	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0547	NA	NA	NA	-
12	rs796973621:C>T	MIR10527	CC, 3; CT, 5	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0428	NA	NA	NA	-
13	rs796153424:A>T	MIR10527	AA, 3; AT, 5	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0212	NA	NA	NA	-
14	rs878994369:T>C	MIR10527	TT, 4; TC, 4	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0139	NA	NA	NA	-

Таблица 1. Окончание

№	dbSNP:ref/alt	Ген микроРНК	Генотип, кол-во пациентов	Уровень экспрессии микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий ($n = 7$)	MAF alt (gnomAD)	Локализация SNV относительно микроРНК	MFE	MFE deltaG ref/alt	Ассоциация с атеросклерозом сонных и коронарных артерий и его осложнениями (HMDD, NCBI)
15	rs796405877:G>A	MIR10527	GG, 6; GA, 2	miR-10527-5p = 3.2 [3.0; 3.6]	0.0071	NA	NA	NA	—
16	rs2682818:A>C	MIR618	AA, 1; AC, 2; CC, 5	miR-618 = 2.7 [1.6; 3.1]	0.8077	arm3p/miR-618	seed	-34.5/-38.3	ИИ [37]
17	rs75330474:C>T	MIR323B	CC, 7; CT, 1	miR-323b-3p = 3.4 [2.1; 3.7]	0.0249	mature5p/miR-323b	no change	-40.2/-40.2	—
18	rs41280052:G>T	MIR184	GG, 8	miR-184 = 2.3 [1.6; 4.0]	0.0110	arm5p/miR-184	arm	-37.2/-37	—
19	rs650162:A>C	MIR423	AA, 3; AC, 3; CC, 2	miR-423-5p = 12.1 [10.4; 12.3]; miR-423-3p = 11.6 [10.8; 11.7];	0.4244	arm3p/miR-423	no change	-48.6/-48.6	ИБС [39]
20	rs745666:G>C	MIR3615	GG, 4; GC, 3; CC, 1	miR-3615 = 6.1 [6.0; 7.1]	0.4086	arm3p/miR-3615	no change	-45.4/-45.4	—
21	rs95819:T>C	MIR27A	TT, 1; TC, 6; CC, 1	miR-27a-3p = 12.9 [12.0; 13.3]; miR-27a-5p = 7.9 [6.4; 8.0]	0.3732	loop/miR-27a	no change	-37.8/-37.8	ИМ [40], АТ [49]
22	rs3746444:A>G	MIR499A	AA, 5; AG, 2; GG, 1	miR-499a-5p = 4.5 [3.9; 4.9]	0.1862	mature5p/miR-499b	seed	-25.4/-21	ИИ [13]; ИБС [15]; ИМ [41, 42]
23	rs19982597:G>A	MIR363	GG, 6; AA, 2	miR-363-3p = 6.5 [5.7; 8.2]	0.0022	mature5p/miR-363	mature	-26.4/-23.7	АТ [50]
24	rs5907732:GT	MIR320D2	GG, 2; TT, 6	miR-320d = 3.4 [2.6; 5.3]	0.7043	upstream/miR-320d-2	NA	NA	—

Примечание: dbSNP – согласно базе данных NCBI; ref/alt – референсный/альтернативный аллель; MAF – частота минорного аллеля, gnomAD – база данных Genome Aggregation Database; MFE – минимальная свободная энергия; ИИ – ишемический инсульт; ИМ – инфаркт миокарда, АТ – атеросклероз; mature – зрелая микроРНК; arm – плечо микроРНК; seed – область “седа” микроРНК; loop – петля микроРНК, upstream – расположено выше по отношению к микроРНК; no change – нет изменений; NA – нет данных. Полуширинным шрифтом в столбце 5 выделены микроРНК, уровень которых выше 10 log₂(СРМ); столбец 6 – частые генетические варианты в популяции (частота MAF gnomAD ≥ 5%); столбец 7, 7 и 8 – показатели, важные для предсказания *in silico* SNV, обладающие наибольшей потенциальной функциональной значимостью в отношении экспрессии микроРНК.

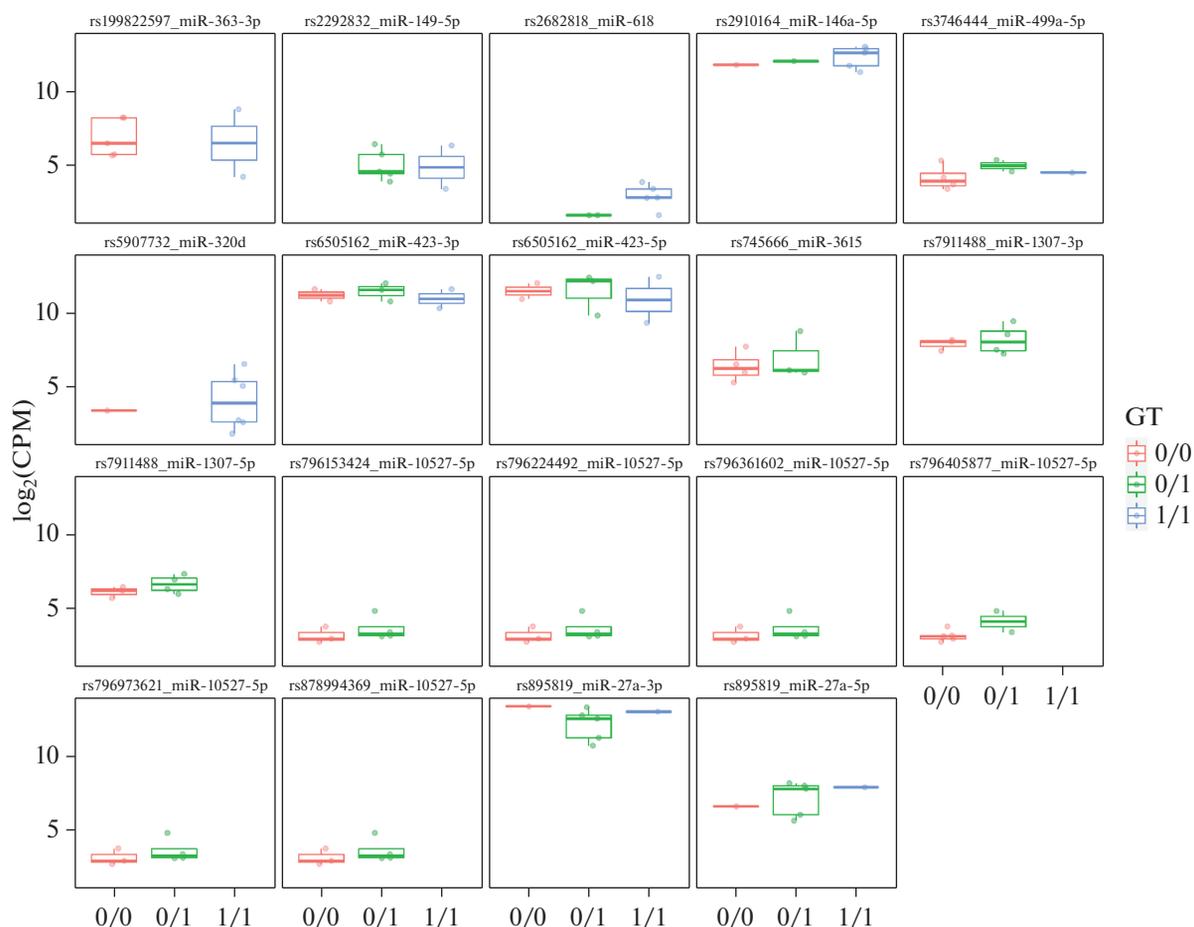


Рис. 1. Уровень экспрессии 19 микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий в зависимости от генотипа пациентов по SNV, расположенных в области генов микроРНК. GT – генотипы; 0/0 – гомозиготы по референсному аллелю; 1/1 – гомозиготы по альтернативному аллелю; 0/1 – гетерозиготы. Над каждой ячейкой приведено название SNV и соответствующей микроРНК; по оси X приведены генотипы (0/0, 0/1 и 1/1), а по оси Y – уровень экспрессии микроРНК.

генотипы AC/AA rs2682818 выступают в роли негативного прогностического фактора рецидива ишемического инсульта [37].

Из всех микроРНК, экспрессирующихся в атеросклеротических бляшках сонных артерий, наиболее хорошо изучена miR-146a (табл. 1). Экспрессия miR-146a повышается в атеросклеротических бляшках человека и мыши, при этом она ингибирует передачу сигналов через NF-κB в эндотелиальных клетках и макрофагах путем интерференции с TRAF6 и IRAK1/2, тем самым снижая экспрессию провоспалительных цитокинов [7, 46, 52–54]. Таким образом, miR-146a представляет собой противовоспалительную микроРНК, которая придает атеропротективные свойства стенке сосуда.

Генетические варианты в пре-микроРНК затрагивают процессинг отдельных микроРНК и, соответственно, снижают уровень зрелой микроРНК. В частности, наиболее активно при ате-

росклерозе и его осложнениях изучали вариант rs2910164:C>G гена *MIR146A*. Однако ассоциации этого полиморфизма с фенотипами атеросклероза сонных и коронарных артерий анализировали, главным образом, в популяциях Азии. Лишь в одной работе показана связь генотипа CC rs2910164 гена *MIR146A* с риском рестеноза коронарных артерий у европейцев в популяции Германии [55]. Согласно данным gnomAD, частоты минорного аллеля C rs2910164 различаются в популяциях Восточной Азии и Европы – 63 и 23% соответственно.

В связи с этим, в рамках настоящего исследования проведено генотипирование лейкоцитов крови пациентов с осложненным течением атеросклероза сонных артерий и у относительно здоровых жителей Западной Сибири, этнических славян, по полиморфному варианту rs2910164 гена *MIR146A* (табл. 2). Сравнение частот аллелей и генотипов данного полиморфизма в этих двух группах выявило ассоциацию аллеля C и генотипов

Таблица 2. Распределение аллелей и генотипов rs2910164 (G>C) гена *MIR146A* у пациентов с осложненным течением атеросклероза сонных артерий и у относительно здоровых жителей Западной Сибири славянского происхождения

Генотип/аллель	Здоровые индивиды, абс. кол-во (%)	Пациенты с клинически выраженным атеросклерозом, абс. кол-во (%)	χ^2 ; OR (95%CI); p
GG	46 (63.9)	42 (37.5)	$\chi^2 = 11.20$; OR = 2.95 (95% CI: 1.60–5.45); $p = 0.001$
GC + CC	26 (36.1)	70 (62.5)	
G	116 (80.5)	143 (63.8)	$\chi^2 = 10.96$ OR = 2.35 (95% CI: 1.43–3.85) $p = 0.001$
C	28 (19.5)	81 (36.2)	

(CC+GC) rs2910164 гена *MIR146A* с риском клинически выраженного атеросклероза сонных артерий: OR = 2.35 (95%CI: 1.43–3.85), $p = 0.001$, OR = 2.95 (95% CI: 1.60–5.45) $p = 0.001$.

Следует отметить, что в популяциях Азии генотип CC rs2910164 (*MIR146A*) связан с риском ИБС, но аллель G/генотип GG ассоциирован с риском осложненного течения атеросклероза сонных и коронарных артерий – ОНМК и ИМ [12, 13, 36]. В нашей работе установлена ассоциация аллеля C и генотипов (CC+GC) rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий жителей Западной Сибири славянского происхождения, однако связь с ОНМК остается неясной, поскольку острые сосудистые события зарегистрированы у 38 человек из общей выборки, что недостаточно для анализа.

Полиморфизм rs2910164 приводит к замене нуклеотидов G>C в последовательности премикроРНК гена *MIR146A* и далее в “пассажирской цепи” зрелой miR-146a-3p. В результате нарушается процессинг пре-miR-146a, конформация ее вторичной структуры и стабильность, уменьшается продукция зрелой miR-146a в клеточной линии U2OS [56]. В этой работе показано, что генотип CC и аллель C rs2910164 связаны со снижением экспрессии miR-146a в клетках, что увеличивает содержание мРНК ее мишеней (IRAK1, TRAF6), внося вклад в формирование провоспалительного профиля и, следовательно, риска заболевания.

Однако в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов с ИБС и генотипом CC rs2910164 гена *MIR146A* выявлено повышение уровня miR-146a и снижение уровня IRAK-1, TRAF-6, NF- κ B и C-реактивного белка по сравнению с носителями генотипа GG [52]. Кроме того, в работе Xiong и соавт. показана ассоциация генотипов GC/CC rs2910164 с риском развития ИБС и увеличением экспрессии miR-146a в мо-

нонуклеарных клетках крови пациентов [57]. В то же время при сахарном диабете типа 2, который часто регистрируется у пациентов с атеросклеротическим поражением артерий, снижение уровня miR-146a в мононуклеарных клетках крови связано с генотипом CC rs2910164 [58]. Однако нами не выявлено связи между экспрессией miR-146a-5p в атеросклеротических бляшках сонных артерий и генотипом rs2910164 гена *MIR146A*. Возможно, существуют клеточно- и тканеспецифичные различия в экспрессии miR-146a у носителей разных генотипов rs2910164 гена *MIR146A* в зависимости от стадии и русла атеросклеротического поражения артерий, коморбидного статуса пациентов.

С другой стороны, относительно малый размер выборок, используемых для анализа связи между полиморфизмом гена и экспрессией микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий, может быть причиной различий в результатах, полученных в нашей и других работах. Кроме того, результаты изучения ассоциации rs2910164 гена *MIR146A* с патологией необходимо реплицировать на больших по размеру и разных по этническому составу выборках, в том числе, включающих пациентов разного пола, с атеросклеротическим поражением артерий разной локализации и их осложнениями. Не исключено, что кумулятивный эффект не одного, а многих генетических вариантов, в том числе локализованных в области генов микроРНК, и факторов среды играет существенную роль в формировании предрасположенности к атеросклеротическому поражению артерий.

Результаты анализа ассоциаций полиморфизма генов микроРНК с атеросклерозом необходимо интерпретировать в контексте оценки экспрессии пре- и зрелой микроРНК и их мишеней в клетках/тканях органов-мишеней патологии. С целью установления причинно-следственных отношений и детальных молекулярно-генетических механизмов эти работы следует дополнять функциональными исследованиями с использо-

ванием культур клеток и модельных животных. Так, показано, что miR-146a вносит вклад в формирование и стабильность атеросклеротических бляшек, регулируя пролиферацию гладкомышечных клеток через сигнальный путь Notch и процесс воспаления в макрофагах IRAK1/TRAF6/NF- κ B [59, 60]. Однако функциональная значимость miR-618 при атеросклерозе остается неясной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании впервые охарактеризован спектр SNV в генах микроРНК у проживающих в Западной Сибири этнических славян, с клинически выраженным атеросклерозом сонных артерий. С помощью секвенирования экзонов и микроРНК оценена экспрессия зрелых микроРНК в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Выявлены 24 SNV, расположенных в 18 генах микроРНК, которые экспрессируются в атеросклеротических бляшках сонных артерий. Показано снижение экспрессии miR-618 в атеросклеротических бляшках сонных артерий у пациентов с генотипом AC rs2682818 гена *MIR618* по сравнению с генотипом CC ($\log_2FC = 4.8$; $p = 0.012$). Установлена ассоциация аллеля C и генотипов (GC+CC) полиморфного варианта rs2910164 гена *MIR146A* с риском развития клинически выраженного атеросклероза сонных артерий у славян, проживающих в Западной Сибири (OR = 2.35; 95% CI: 1.43–3.85; $p = 0.001$, OR = 2.95; 95% CI: 1.60–5.45; $p = 0.001$ соответственно).

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Проведение данной работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Все доноры подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Song P., Fang Z., Wang H., Cai Y., Rahimi K., Zhu Y., Fowkes F., Fowkes F., Rudan I. (2020) Global and regional prevalence, burden, and risk factors for carotid atherosclerosis: a systematic review, meta-analysis, and modelling study. *Lancet Glob. Hlth.* **8**(5), e721–e729.
2. Libby P., Bornfeldt K.E., Tall A.R. (2016) Atherosclerosis: successes, surprises, and future challenges. *Circ. Res.* **118**(4), 531–534.
3. Gebert L.F.R., MacRae I.J. (2019) Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **20**(1), 21–37.
4. Borghini A., Andreassi M.G. (2018) Genetic polymorphisms offer insight into the causal role of microRNA in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* **269**, 63–70.
5. Króliczewski J., Sobolewska A., Lejnowski D., Collawn J.F., Bartoszewski R. (2018) microRNA single polynucleotide polymorphism influences on microRNA biogenesis and mRNA target specificity. *Gene.* **640**, 66–72.
6. Li Y., Huo C., Pan T., Li L., Jin X., Lin X., Chen J., Zhang J., Guo Z., Xu J., Li X. (2019) Systematic review regulatory principles of non-coding RNAs in cardiovascular diseases. *Brief. Bioinform.* **20**(1), 66–76.
7. Feinberg M.W., Moore K.J. (2016) MicroRNA regulation of atherosclerosis. *Circ. Res.* **118**(4), 703–720.
8. Ghanbari M., Franco O.H., de Looper H.W., Hofman A., Erkeland S.J., Dehghan A. (2015) Genetic variations in microRNA-binding sites affect microRNA-mediated regulation of several genes associated with cardio-metabolic phenotypes. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **8**(3), 473–486.
9. Fasolo F., Di Gregoli K., Maegdefessel L., Johnson J.L. (2019) Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* **115**(12), 1732–1756.
10. Huang Z., Shi J., Gao Y., Cui C., Zhang S., Li J., Zhou Y., Cui Q. (2019) HMDD v3.0: a database for experimentally supported human microRNA-disease associations. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D1013–D1017.
11. He Y., Yang J., Kong D., Lin J., Xu C., Ren H., Ouyang P., Ding Y., Wang K. (2015) Association of miR-146a rs2910164 polymorphism with cardio-cerebrovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. *Gene.* **565**(2), 171–179.
12. Bao M.H., Xiao Y., Zhang Q.S., Luo H.Q., Luo J., Zhao J., Li G.Y., Zeng J., Li J.M. (2015) Meta-analysis of miR-146a polymorphisms association with coronary artery diseases and ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* **16**(7), 14305–14317.
13. Zhu J., Yue H., Qiao C., Li Y. (2015) Association between single-nucleotide polymorphism (SNP) in miR-146a, miR-196a2, and miR-499 and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Med. Sci. Monit.* **21**, 3658–3663.
14. Zhao D., Li Y., Yu X., Zhu Y., Ma B. (2019) Associations between miR-146a rs2910164 polymorphisms and risk of ischemic cardio-cerebrovascular diseases. *Medicine.* **98**(42), e17106.
15. Bastami M., Choupani J., Saadatian Z., Zununi Vahed S., Mansoori Y., Daraei A., Samadi Kafil H., Masotti A., Nariman-Saleh-Fam Z. (2019) miRNA polymorphisms and risk of cardio-cerebrovascular diseases: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(2), 293.
16. Elfaki I., Mir R., Mir M.M., AbuDuhier F.M., Babakr A.T., Barnawi J. (2019) Potential impact of microRNA gene polymorphisms in the pathogenesis of diabetes and atherosclerotic cardiovascular disease. *J. Personalized Med.* **9**(4), 51.
17. Raitoharju E., Oksala N., Lehtimäki T. (2013) MicroRNAs in the atherosclerotic plaque. *Clin. Chem.* **59**(12), 1708–1721.
18. Maitrias P., Metzinger-Le Meuth V., Nader J., Reix T., Caus T., Metzinger L. (2017) The involvement of miRNA in carotid-related stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **37**(9), 1608–1617.

19. Назаренко М.С., Королёва Ю.А., Зарубин А.А., Слепцов А.А. (2022) Регулом микроРНК при различных фенотипах атеросклероза. *Молекуляр. биология*. **56**(2), 227–243.
20. Sleptcov A.A., Zarubin A.A., Bogaychuk P.M., Kuznetsov M.S., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. (2021) Human exome sequence data in support of somatic mosaicism in carotid atherosclerosis. *Data Brief*. **39**, 107656.
21. Van der Auwera G.A., O'Connor B.D. (2020) *Genomics in the Cloud: Using Docker, GATK, and WDL in Terra*. O'Reilly Media, Inc. p. 496.
22. Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
23. Andrés-León E., Núñez-Torres R., Rojas A.M. (2016) miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. *Sci. Rep.* **6**, 25749.
24. Krueger F., James F., Ewels P., Afyounian E., Schuster-Boeckler B. (2021) FelixKrueger/TrimGalore: v0.6.7 – DOI via Zenodo. Zenodo.
25. Li H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv Preprint arXiv*. 1303.3997.
26. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* (Oxford). **30**(7), 923–930.
27. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D155–D162.
28. Cammaerts S., Strazisar M., Dierckx J., Del Favero J., De Rijk P. (2016) miRVaS: a tool to predict the impact of genetic variants on miRNAs. *Nucl. Acids Res.* **44**(3), e23.
29. Huang Z., Shi J., Gao Y., Cui C., Zhang S., Li J., Zhou Z., Cui Q. (2019) HMDD v3. 0: a database for experimentally supported human microRNA–disease associations. *Nucl. Acids Res.* **47**(D1), D1013–D1017.
30. Yamashita J., Iwakiri T., Fukushima S., Jinnin M., Miyashita A., Hamasaki T., Makino T., Aoi J., Masuguchi S., Inoue Y., Ihn H. (2013) The rs2910164 G > C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant melanoma. *Melanoma Res.* **23**(1), 13–20.
31. Omariba G., Xu F., Wang M., Li K., Zhou Y., Xiao J. (2020) Genome-wide analysis of microRNA-related single nucleotide polymorphisms (SNPs) in mouse genome. *Sci. Rep.* **10**(1), 5789.
32. Sharma A.R., Shashikiran U., Uk A.R., Shetty R., Sathyamoorthy K., Rai P.S. (2020) Aberrant DNA methylation and miRNAs in coronary artery diseases and stroke: a systematic review. *Brief. Funct. Genomics*. **19**(4), 259–285.
33. De Rie D., Abugessaisa I., Alam T., Arner E., Arner P., Ashoor H., Åström G., Babina M., Bertin N., Burroughs A.M., Carlisle A.J., Daub C.O., Detmar M., Deviatiiarov R., Fort A., Gebhard C., Goldowitz D., Guhl S., Ha T.J., Harshbarger J., Hasegawa A., Hashimoto K., Herlyn M., Heutink P., Hitchens K.J., Hon C.C., Huang E., Ishizu Y., Kai C., Kasukawa T., Klinken P., Lassmann T., Lecellier C.H., Lee W., Lizio M., Makeev V., Mathelier A., Medvedeva Y.A., Mejhert N., Mungall C.J., Noma S., Ohshima M., Okada-Hatakeyama M., Persson H., Rizzu P., Roudnický F., Sætrom P., Sato H., Severin J., Shin J.W., Swoboda R.K., Tarui H., Toyoda H., Vitting-Seerup K., Winteringham L., Yamaguchi Y., Yasuzawa K., Yoneda M., Yumoto N., Zabierowski S., Zhang P.G., Wells C.A., Summers K.M., Kawaji H., Sandelin A., Rehli M.; FANTOM Consortium, Hayashizaki Y., Carninci P., Forrest A.R.R., de Hoon M.J.L. (2017) An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat. Biotechnol.* **35**(9), 872–878.
34. Zou D., Liu C., Zhang Q., Li X., Qin G., Huang Q., Meng Y., Chen L., Wei J. (2018) Association between polymorphisms in microRNAs and ischemic stroke in an Asian population: evidence based on 6,083 cases and 7,248 controls. *Clin. Interv. Aging*. **13**, 1709–1726.
35. Zhu R., Wang Q.W., Zhao J., Liu X., He Z. (2020) miR-149 and miR-499 gene polymorphism and the incident of ischemic stroke in the Asian population: from a case-control study to meta-analysis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **193**, 105789.
36. Wang M., Wang S., Wang X., Wu J., Wu Y., Wang Z., Wang J., Wu T., Hu Y. (2020) Carotid intima-media thickness, genetic risk, and ischemic stroke: a family-based study in Rural China. *Int. J. Environ. Res. Publ. Hlth.* **18**(1), 119.
37. Zhang Z., Xu G., Cai B., Zhang H., Zhu W., Liu X. (2017) Genetic variants in microRNAs predict recurrence of ischemic stroke. *Mol. Neurobiol.* **54**(4), 2776–2780.
38. Sung J.H., Kim S.H., Yang W.I., Kim W.J., Moon J.Y., Kim I.J., Cha D.H., Cho S.Y., Kim J.O., Kim K.A., Kim O.J., Lim S.W., Kim N.K. (2016) miRNA polymorphisms (miR-146a, miR-149, miR-196a2 and miR-499) are associated with the risk of coronary artery disease. *Mol. Med. Rep.* **14**(3), 2328–2342.
39. Jha C.K., Mir R., Elfaki I., Khullar N., Rehman S., Javid J., Banu S., Chahal S. (2019) Potential impact of microRNA-423 gene variability in coronary artery disease. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*. **19**(1), 67–74.
40. Cai M.Y., Cheng J., Zhou M.Y., Liang L.L., Lian S.M., Xie X.S., Xu S., Liu X., Xiong X.D. (2018) The association between pre-miR-27a rs895819 polymorphism and myocardial infarction risk in a Chinese Han population. *Lipids Hlth Dis.* **17**(1), 7.
41. Chen C., Hong H., Chen L., Shi X., Chen Y., Weng Q. (2014) Association of microRNA polymorphisms with the risk of myocardial infarction in a Chinese population. *Tohoku J. Exp. Med.* **233**(2), 89–94.
42. Yang Y., Shi X., Du Z., Zhou G., Zhang X. (2021) Associations between genetic variations in microRNA and myocardial infarction susceptibility: a meta-analysis and systematic review. *Herz.* **47**(6), 524–535. <https://doi.org/10.1007/s00059-021-05086-3>
43. Sun B., Cao Q., Meng M., Wang X. (2020) MicroRNA-186-5p serves as a diagnostic biomarker in atherosclerosis and regulates vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Cell Mol. Biol. Lett.* **25**, 27.
44. Zhang S., Zhu X., Li G. (2020) E2F1/SNHG7/miR-186-5p/MMP2 axis modulates the proliferation and

- migration of vascular endothelial cell in atherosclerosis. *Life Sci.* **257**, 118013.
45. Ye Z.M., Yang S., Xia Y.P., Hu R.T., Chen S., Li B.W., Chen S.L., Luo X.Y., Mao L., Li Y., Jin H., Qin C., Hu B. (2019) LncRNA MIAT sponges miR-149-5p to inhibit efferocytosis in advanced atherosclerosis through CD47 upregulation. *Cell Death Dis.* **10**(2), 138.
 46. Hou J., Deng Q., Deng X., Zhong W., Liu S., Zhong Z. (2021) MicroRNA-146a-5p alleviates lipopolysaccharide-induced NLRP3 inflammasome injury and pro-inflammatory cytokine production via the regulation of TRAF6 and IRAK1 in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Ann. Transl. Med.* **9**(18), 1433.
 47. Huang S.F., Zhao G., Peng X.F., Ye W.C. (2021) The pathogenic role of long non-coding RNA H19 in atherosclerosis via the miR-146a-5p/ANGPTL4 pathway. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 770163.
 48. Qin S.B., Peng D.Y., Lu J.M., Ke Z.P. (2018) MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4. *J. Cell Physiol.* **233**(10), 6630–6637.
 49. Choe N., Kwon D.H., Ryu J., Shin S., Cho H.J., Joung H., Eom G.H., Ahn Y., Park W.J., Nam K.I., Kim Y.K., Kook H. (2020) miR-27a-3p targets ATF3 to reduce calcium deposition in vascular smooth muscle cells. *Mol. Ther. Nucl. Acids.* **22**, 627–639.
 50. Zhou T., Li S., Yang L., Xiang D. (2021) microRNA-363-3p reduces endothelial cell inflammatory responses in coronary heart disease via inactivation of the NOX4-dependent p38 MAPK axis. *Aging.* **13**(8), 11061–11082.
 51. Fu A., Hoffman A.E., Liu R., Jacobs D.I., Zheng T., Zhu Y. (2014) Targetome profiling and functional genetics implicate miR-618 in lymphomagenesis. *Epi-genetics.* **9**(5), 730–737.
 52. Ramkaran P., Khan S., Phulukdaree A., Moodley D., Chuturgoon A.A. (2014) miR-146a polymorphism influences levels of miR-146a, IRAK-1, and TRAF-6 in young patients with coronary artery disease. *Cell. Biochem. Biophys.* **68**(2), 259–266.
 53. Raitoharju E., Lyytikäinen L.P., Levula M., Oksala N., Mennander A., Tarkka M., Klopp N., Illig T., Kähönen M., Karhunen P.J., Laaksonen R., Lehtimäki T. (2011) miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis.* **219**(1), 211–217.
 54. Takahashi Y., Satoh M., Minami Y., Tabuchi T., Itoh T., Nakamura M. (2010) Expression of miR-146a is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. *Clin. Sci. (Lond).* **119**(9), 395–405.
 55. Hamann L., Glaeser C., Schulz S., Gross M., Franke A., Nöthlings U., Schumann R.R. (2014) A micro RNA-146a polymorphism is associated with coronary restenosis. *Int. J. Immunogenet.* **41**(5), 393–396.
 56. Jazdzewski K., Murray E.L., Franssila K., Jarzab B., Schoenberg D.R., de la Chapelle A. (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**(20), 7269–7274.
 57. Xiong X.D., Cho M., Cai X.P., Cheng J., Jing X., Cen J.M., Liu X., Yang X.L., Suh Y. (2014) A common variant in pre-miR-146 is associated with coronary artery disease risk and its mature miRNA expression. *Mutat. Res.* **761**, 15–20.
 58. Alipoor B., Ghaedi H., Meshkani R., Omrani M.D., Sharifi Z., Golmohammadi T. (2018) The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes. *J. Endocrinol. Invest.* **41**(5), 557–566.
 59. Cao J., Zhang K., Zheng J., Dong R. (2015) MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **11**(4), 2889–2895.
 60. Chu T., Xu X., Ruan Z., Wu L., Zhou M., Zhu G. (2022) miR-146a contributes to atherosclerotic plaque stability by regulating the expression of TRAF6 and IRAK-1. *Mol. Biol. Rep.* **49**(6), 4205–4216. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07253-z>

Identification of Functionally Significant Polymorphic Variants in miRNA Genes in Carotid Atherosclerosis

A. A. Zarubin¹, K. V. Mannanova², I. A. Koroleva¹, A. A. Sleptcov¹,
M. S. Kuznetsov³, B. N. Kozlov³, and M. S. Nazarenko^{1,2,*}

¹Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

²Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia

³Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634050 Russia

*e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru

miRNAs are vital molecules of gene expression. They are involved in the pathogenesis of various common diseases, including atherosclerosis, its risk factors and complications. A detailed characterization of the spectrum of functionally significant polymorphisms of miRNA genes of patients with advanced carotid atherosclerosis is an actual research task. We analyzed miRNA expression and exome sequencing data of carotid atherosclerotic plaques of the same male patients ($n = 8$, 66–71 years of age, 67–90% degree of carotid artery stenosis). For further study and analysis of the association between rs2910164 polymorphism of the *MIR146A*

gene and advanced carotid atherosclerosis, we recruited 112 patients and 72 relatively healthy Slavic residents of Western Siberia. 321 and 97 single nucleotide variants (SNVs) were detected in the nucleotide sequences of pre- and mature miRNAs in carotid atherosclerotic plaques. These variants were located in 206 and 76 miRNA genes, respectively. Integration the data of exome sequencing and miRNA expression revealed 24 SNVs of 18 miRNA genes which were processed to mature form in carotid atherosclerotic plaques. SNVs with the greatest potential functional significance for miRNA expression predicted *in silico* were rs2910164:C>G (*MIR146A*), rs2682818:A>C (*MIR618*), rs3746444:A>G (*MIR499A*), rs776722712:C>T (*MIR186*), rs199822597:G>A (*MIR363*). The expression of miR-618 was lower in carotid atherosclerotic plaques of patients with the AC rs2682818 genotype of the *MIR618* gene compared with the CC genotype ($\log_2FC = 4.8$; $p = 0.012$). We also found the association of rs2910164:C (*MIR146A*) with the risk of advanced carotid atherosclerosis (OR = 2.35; 95% CI: 1.43–3.85; $p = 0.001$). Integrative analysis of polymorphism in miRNA genes and miRNA expression is informative for identifying functionally significant polymorphisms in miRNA genes. The rs2682818:A>C (*MIR618*) is a candidate for regulating miRNA expression in carotid atherosclerotic plaques. The rs2910164:C (*MIR146A*) is associated with the risk of advanced carotid atherosclerosis.

Keywords: miRNA, sequencing, carotid atherosclerosis