

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет біології, географії та екології
Кафедра біології людини та імунології

Next generation sequencing як метод дослідження генетичної
варіативності людської популяції

Кваліфікаційна робота (проєкт)
на здобуття ступеня вищої освіти “магістр”

Виконала: здобувачка 2 курсу 211- М
групи

Спеціальності: 091 Біологія

Освітньо-професійної програми:
Біологія

Біркун Вікторія Володимирівна

Керівники: доц.,к.б.н. Шкуропат
Анастасія

Рецензент: Панченко Галина, лікар
бактеріолог, ДУ "Херсонський
обласний лабораторний центр МОЗ
України"

Зміст

ВСТУП	3
РОЗДІЛ 1. ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНОМНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛЮДСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ	6
1.1. Багатофакторні хвороби людини	6
1.2. Прийоми дослідження багатофакторних захворювань	11
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ ЛЮДИНИ	19
2.1. Методика проведення NGS	19
РОЗДІЛ 3. ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛЮДСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ТА ЗВ'ЯЗОК ІЗ ХВОРОБАМИ СЕРЕДНЬОГО ВІКУ	24
3.1. Дослідження поліморфізму генів при онкологічних хворобах та їхнє значення	24
3.2. Дослідження поліморфізму генів при психіатричних хворобах та їхнє значення	26
3.3. Дослідження поліморфізму генів при серцево-судинних хворобах та їхнє значення	30
ВИСНОВКИ	35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	36

ВСТУП

Актуальність теми.

Геном всіх людей є ідентичним на 98,5%. Інші 1,5% лежать в основі всіх індивідуальних відмінностей, що включає морфологічна, біохімічні відмінності. Кожний фенотип формується у взаємодії гена із середовищем. Такий поліморфізм різноманітних ознак людини забезпечує індивідуальну варіативність відповіді на фактори оточуючого середовища. Різні дієти, шкідливі звички, кліматичні умови по різному сприймаються різними організмами якраз через поліморфізми генів. Різні варіанти одного гену називаються алелями [4, 7, 19-24].

Сучасна наука має арсенал для дослідження особливостей геному людини. Інтенсифікацію геномних досліджень та варіативності людської популяції спричинило застосування next generation sequencing (NGS)/ Існують різні варіанти дослідження геному - повногеномне секвенування, дослідження тільки кодуючої частини геному - повноекзомне секвенування, повногеномний пошук асоціацій. Це створює можливість для дослідження вкладу поліморфізмів генів в популяції людей в розвиток хвороб, реакцію організму на терапевтичні препарати та фактори зовнішнього середовища [15].

До хвороб зі спадковою схильністю відносяться хвороби, розвиток яких залежить від певної взаємодії між спадковими факторами (певні алелі генів, мутації) та факторів середовища [24, 38]. Причини таких хвороб досягають потребують з'ясування. Ці хвороби пов'язані із поліморфізмом популяції людей за різними параметрами: активність ферментів, особливостями транспортних, структурних білків, системами антигенів тощо.

Давно відомо, що такі розлади, як цукровий діабет II типу, захворювання серцево-судинної системи, онкологічні захворювання

мають генетичне підґрунтя, проте точні генетичні локуси, зміни в них, що пов'язані із ризиком розвитку захворювання, були невідомими. Вивчення геномних індивідуальних особливостей, з'ясування генів схильності при деяких хворобах може використовуватися з одного боку, для створення діагностики та виявлення людей ризику, з іншого боку - для розуміння патогенезу захворювання та встановлення біохімічних шляхів, що призводять до виникнення хвороби.

Вивчення групи генів, які приймають участь у розвитку діабету II типу, захворюваннях серцево-судинної системи, онкологічних захворюваннях, необхідні для повного розуміння біології онкології, розробки нових методів лікування, методів профілактики і ранньої діагностики. Дослідження SNP дозволяють знайти варіанти тих генів, що співставляються з фенотипом онкологічних трансформацій.

Сучасні технології секвенування такі як NGS (next generation sequencing) дозволяють проводити повногеномне секвенування за один день. Це дає можливість для обстеження популяції людей, проведення пошуку геномних асоціацій із виникненням певного захворювання, розповсюдження алелей таких генів в популяції. Накопичення даних в цій галузі та подальший їх аналіз призведе до розробки концепції персоналізованої медицини. Це дасть можливість прорахунку ризику виникнення тієї чи іншої хвороби у людини на основі вивчення її геному, способу життя та оточуючого середовища.

Метою роботи - на основі аналізу літературних джерел вивчити генетичний компонент захворювань середнього віку на прикладі онкологічних, психіатричних та серцево-судинних хвороб.

Об'єкт дослідження – генетика хвороб середнього віку.

Предмет дослідження – роль SNP окремих генів у розвиток хвороб середнього віку

Завдання дослідження:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо методів дослідження геному людини, встановлення SNP та інших мутації

2. Вивчити стан дослідження генетичних маркерів онкологічних, психіатричних та серцево-судинних хвороб

Методи дослідження: аналіз літературних джерел

Зв'язок роботи з науковими темами кафедри.

Практичне значення. Отримані результати можна використовувати під час викладання курсу “Генетика з основами селекції”, “Генетика людини”, “Молекулярна біологія”.

Наукова новизна отриманих результатів: В кваліфікаційній роботі проаналізовано генетичні дослідження генетичного підґрунтя багатофакторних хвороб середнього віку. Зроблено узагальнення щодо внеску певних алелей генів у патогенез таких хвороб.

РОЗДІЛ 1

ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНОМНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ ДЛЯ ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛЮДСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ

1.1. Багатофакторні хвороби людини

Давно відомо, що такі розлади, як цукровий діабет II типу, захворювання серцево-судинної системи, онкологічні захворювання мають генетичне підґрунтя, проте точні генетичні локуси, зміни в них, що пов'язані із ризиком розвитку захворювання, були невідомими. Вивчення геномних індивідуальних особливостей, з'ясування генів схильності при деяких хворобах може використовуватися з одного боку, для створення діагностики та виявлення людей ризику, з іншого боку - для розуміння патогенезу захворювання та встановлення біохімічних шляхів, що призводять до виникнення хвороби.

Геном всіх людей є ідентичним на 98,5%. Інші 1,5% лежать в основі всіх індивідуальних відмінностей, що включає морфологічна, біохімічні відмінності. Кожний фенотип формується у взаємодії гена із середовищем. Такий поліморфізм різноманітних ознак людини забезпечує індивідуальну варіативність відповіді на фактори оточуючого середовища. Різні дієти, шкідливі звички, кліматичні умови по різному сприймаються різними організмами якраз через поліморфізми генів. Різні варіанти одного гену називаються алелями. [34]

Сучасна наука має арсенал для дослідження особливостей геному людини. Інтенсифікацію геномних досліджень та варіативності людської популяції спричинило застосування next generation sequencing (NGS)/ Існують різні варіанти дослідження геному - повногеномне секвенування, дослідження тільки кодуючої частини геному - повноекзомне секвенування, повногеномний пошук асоціацій. Це

створює можливість для дослідження вкладу поліморфізмів генів в популяції людей в розвиток хвороб, реакцію організму на терапевтичні препарати та фактори зовнішнього середовища [4, 7, 19-24].

Встановлення мутацій в ДНК, пов'язаних з певних хвороб - є давньою метою медичної генетики. Розширення інструментарію генетики дозволив перейти від опису ознак до безпосереднього вивчення змін нуклеотидних послідовностей [1, 19].

Геном - це найкращий об'єкт для вивчення біології живого організму. Інформація, закодована в геномі, керує процесом ембріонального розвитку, морфогенетичним процесами та онтогенетичними змінами. Змінами в геномі можна пояснити виникнення багатьох хвороб. Найшвидший за своїм розвитком розділ генетики людини - це генетика захворювань. Генетичне дослідження людини як об'єкта концептуально відрізняється від генетичного дослідження дрозофіл, запашного горошку, мишей чи кукурудзи. Висновки про ступінь спадкування ознаки частіше базується на вивчення характеру передачі на великій популяції, на вивчені сімейного анамнезу, дослідження спадкування в ряду поколінь (генеалогічні дослідження) [23].

При встановленні захворювання, що має сімейний характер протікання продовжували пошук генів, які можуть бути пов'язані із цим захворюванням. Для цього використовували клонування функціонального гена, гена кандидата.

SNP (single nucleotide polymorphism, однонуклеотидний поліморфізм) є найбільш розповсюдженою варіацією, що зустрічається в геномі людини. Є бази даних, в яких у вільному доступі викладаються зареєстровані SNP, загальна кількість яких складає близько 9 млн. До таких баз даних відносяться ENSEMBLE (<https://ensembl.org/>), SNPedia(<https://snpedia.com>), OMIM (<https://omim.org/>).

SNP використовують як маркери в багатьох дослідженнях, їх пов'язують з певними фенотиповими виявами. Більшість таких досліджень покликана на поглиблення розуміння фізіології людини та молекулярних механізмів патологічних станів [11, 16, 27].

До хвороб зі спадковою схильністю відносяться хвороби, розвиток яких залежить від певної взаємодії між спадковими факторами (певні алелі генів, мутації) та факторів середовища. Причини таких хвороб досягають потребують з'ясування. Ці хвороби пов'язані із поліморфізмом популяції людей за різними параметрами: активність ферментів, особливостями транспортних, структурних білків, системами антигенів тощо.

В популяції людей близько 30% локусів представлені більше ніж двома алелями. У диплоїдному хромосомному наборі близько 40000 локусів. Це призводить до неймовірної кількості комбінації алелів. Така варіативність забезпечує генетичну унікальність індивідуума, що виражається у фізичних відмінностях, здібностях, реакції організму на чинники довкілля. Хвороби зі спадковою схильністю розвиваються у людей, що мають певні алелі в генотипі та знаходяться під дією провокуючих чинників.



Рис. 1.1. - схема виникнення полігенних хвороб

Хвороби зі спадковою схильністю розділяють на три основних групи [38]:

- 1) вроджені вади розвитку

- 2) розповсюджені психіатричні та неврологічні хвороби
- 3) хвороби середнього віку.

Вроджені вади розвитку

Частіше всього зустрічаються такі вади розвитку - дефекти закриття нервової трубки, вивих стегна, розщелина верхньої губи, клишоногість, вади серця. Тобто, до цих хвороб належать ті вади розвитку, що зустрічаються найчастіше

Розповсюджені психіатричні та неврологічні хвороби

До цих хвороб відноситься шизофренія, маніакально-депресивний психоз, епілепсія, розсіяний склероз

Хвороби середнього віку

До них відносяться псоріаз, виразка шлунку, виразка 12-типалої кишки, бронхіальна астма, ішемічна хвороба серця, цукровий діабет, гіпертензія, онкологічні хвороби.

Хвороби середнього віку мають складну етіологію. Проте генетичний компонент все більше та більше вивчається.

Щоб хворобу виокремити як мультифакторну, вона повинна відповідати певним критерієм:

1. Частота прояву в популяції 1/1000 та вище (табл. 1.1).
2. Серед хворих зустрічається безперервний ряд від норми до важкої патології (ступені хвороби). Наприклад, в популяції є люди, що мають нормальний рівень глюкози, є ті, хто мають підвищений рівень, і є ті, хто мають цукровий діабет. При чому цукровий діабет має теж різні ступені. Таким самим чином можна охарактеризувати і гіпертонію, і ішемічну хворобу серця, і будь-яку хворобу середнього віку.
3. Притаманне сімейне накопичення, тобто, в окремих сім'ях хвороба буде зустрічатися частіше

4. При застосування близнюкового методу конкордантність буде менше 100%. Наприклад, бронхіальна астма має конкордантність на рівні 60-70%.
5. Клінічні картини у близьких родичів схожі.

Табл. 1.1 - Частота зустрічаємості деяких хвороб
зі спадковою схильністю

Групи і нозологічні форми	Поширеність на 1000 осіб (у відповідній віковій групі)
Вроджені вади розвитку	
Щілина губи і піднебіння	1-2
Спинномозкова грижа	1
Пілоростеноз	0,5-3
Аненцефалія і черепно-мозкова грижа	1
Вивих стегна	2-5
Гідроцефалія	0,5
Гіпоспадія	3
Клишоногість	2
Психічні та нервові хвороби	
Шизофренія	10-20
Епілепсія	8-10
Маніакально-депресивний психоз	2-5
Розсіяний склероз	0,02-0,7
Соматичні хвороби середнього віку	
Псоріаз	10-20
Бронхіальна астма	2-5
Виразкова хвороба шлунка і дванадцятипалої кишки	20-50
Ішемічна хвороба серця	50-100
Гіпертонічна хвороба	100-200
Діабет	10-20

6. Мультифакторні хвороби можуть зустрічатися частіше в осіб певної статі. Наприклад, чоловіки частіше хворіють на виразкову хворобу. розщелена губи та піднебіння, жінки - системний червоний вовчак, анацефалія, вроджений вивих стегна.
7. Хвороба може асоціювати з певними генетичними маркерами. Наприклад, HLA, ABO. Варіант B27 HLA асоціюється із анкілозуючим спонділітом, хворобою Рейтера [38].

1.2. Прийоми дослідження багатофакторних захворювань

NGS дозволило проводити багато секвенувань геномів одночасно, що спричинило накопичення великої кількості даних в цій галузі. В свою чергу, NGS лягло в основі таких методів як **повноекзомне секвенування** (whole exome sequencing, WES), **повногеномний пошук асоціацій** (genome-wide association studies, GWAS), **предімплантаційне генетичне тестування (PGT)**.

СМахам та Sanger у 1997 році заклали перші спроби секвенування ДНК. Проте, вони мали ряд обмежень - невелика пропускна здатність, масштабованість, роздільна здатність, швидкість, але велика вартість. Секвенування першого геному людини зайняло 12 років, його вартість складала близько 3 млрд дол США. До цього процесу було залучено сотні дослідників по всьому світу. Як виявилось, методика секвенування геному за Сенгером виявилось непридатним при секвенуванні великих геномів у великих кількостях. Тобто унеможливило дослідження геномів багатьох пацієнтів. Для того, щоб персоніфікована медицина стала реальністю, потрібний був метод, що дозволяв проводити секвенування геному швидко та відносно недорого [15].

Останнє десятиліття, через 15 років після секвенування першого геному, з'явився новий метод - next-generation sequencing (NGS). Він

дозволяє провести секвенуванні геному впродовж одного дня, його вартість на багато менша за вартість секвенуванні за Сенгером - близько 1000 Дол США. Все це дозволило NGS увійти в клінічну практику, де за допомогою цього методу проводять скринінгові дослідження на наявність носійства певного гену, тестування анеуплоїдій у ембріонів, рідкісних хвороб, ризик виникнення та наявність онкологічних змін у клітинах. При NGS відбувається розділення всієї геномної ДНК на невеликі фрагменти по 300-500 пар основ, що складає геномну бібліотеку. Далі створюються мільйони рідів. Результати зчитування порівнюються за допомогою референсного геному або зборки *de novo*. Застосування NGS дозволяє усунути такі методи як функціональне чи позиційне клонування, оскільки досліджується геном хворої людини без попередніх даних про наявність біохімічних маркерів чи знання механізму хвороби [15].

NGS використовується в клінічній практиці саме завдяки високій здатності виявити відмінності у досліджуваному геномі з еталонним. Ці відмінності носять назву "варіанти". Вони бувають двох типів - однонуклеотидні варіанти (small nucleotide polymorphisms, SNP, small nucleotide variant, SNV), короткі вставки/делеції ("indels") та великі вставки/делеції ("del/dup", варіації кількості копій CNVs). NGS здатен виявляти всі зазначені зміни.

Можливість досліджень нуклеотидної послідовності геному людини створила передумови для вивчення генетичної складової багатьох хвороб людини. Перші методи дослідження нуклеотидної послідовності ДНК - секвенування першого покоління - мали суттєві обмеження: невелику пропускну здатність, замалий масштаб, невелику швидкість та роздільну здатність. Революцію у секвенування геномів здійснив метод секвенування наступного покоління - next generation sequencing (NGS). Саме цим методом стало можливим вивчення моногенних та багатофакторних захворювань.

NGS проводиться в декількох варіантах.

Повноекзомне секвенування (whole exome sequencing, WES).

При цьому секвенуванні проводиться дослідження нуклеотидної послідовності тільки кодуючої частини геному - екзому. Секвенування екзому полягає у встановленні повної нуклеотидної послідовності тільки тих ділянок геному, що кодують білок. В геномі людини знаходяться близько 180000 екзонів, що складає лише 2% усього геному.

Вперше ефективність WES було показано при діагностиці синдрому Фрімена-Шелдона (FSS). Це був перший випадок, в якому було продемонстровано, що секвенування тільки екзому може бути чутливим та надійним методом ідентифікації рідкісних алелей при використанні у якості контролю невеликої групи неспоріднених пацієнтів [17, 24].

У подальших дослідженнях WES виявився ефективним при синдромі Міллера, тоді як інші методи лікування не давали ніяких результатів. Це є рідкісною менделевською генетичною хворобою, який також має назву постаксиальний акрофаціальний дистоз - проявляється у черепно-лицьових деформацій, деформацій кінцівок та очей. Особи із синдромом Міллера мають важку мікрогнаті, латеральну розщелену обличчя та піднебіння, колобома повік та зайві соску, очні щілини спрямовані вниз, деформація вушних раковин, широке перенісся, дефекти ребер, серця, хребців тощо. WES у чотирьох індивідів із синдромом та трьох неспоріднених осіб дозволило встановити відмінності в гені *DHODH* в хромосомі 16q22. Це ген кодує дигідрооротатдегідрогеназу, що є ключовим ферментом в біохімічному каскаді піримідину. Розширення спектру досліджуваних дозволило встановити аж 11 різних мутацій в гені *DHODH* у шести різних пацієнтів з синдромом Міллера [14].

Застосування секвенування лише екзому є виправданим, оскільки більшість хвороб (до 85%), що мають генетичне підґрунтя та високу

пенетрантність присутні в ділянці геному, що кодує білки. (Majewski et al., 2011, Botstein and Risch, 2003)

Успішність застосування WES може залежити від позиції алеля, пов'язаного із хворобою, ефективності покриття, способу аналізу даних. Повно екзомне секвенування виявилось ефективним у 60-80% діагностики менделевських хвороб (Gilissen та ін., 2012). Це, в першу чергу, пов'язано із нерівномірним покриттям та ненадійності отриманих результатів. Жоден існуючий наразі проєкт немає повністю анотованого екзона (RefSeq, Ensembl). Екзони, що не анотовані (не ідентифіковані та не охарактеризовані) не включаються при WES. У другу чергу, на ефективність WES впливає наявність великих перебудов геному - хромосомні та геномні мутації, наявність мутацій в мітохондріального геному, та епігенетичні фактори [27].

Окрім того, виявлені алелі певних генів методом WES повинні бути охарактеризовані функціонально. Для випадків, коли ген вже є вивченим, показана його роль на дослідженнях у культурі тканин, на тваринах з ноукатованим геном. Для алелей, що виявляються вперше та мають явний зв'язок із хворобою, потрібно провести дослідження на патогенність, щоб остаточно впевнитися у його ролі в розвитку хвороби. Такі дослідження проводяться у вигляді вивчення нокауту виявленого гена на модельних об'єктах - миші, риби данію, культури клітин ссавців тощо [28].

Наразі необхідність дослідження отриманих результатів на модельних об'єктах та підтвердження патогенного впливу виявленого гену є найбільш вразливим місцем методу WES. Проте, не зважаючи на це, WES є найбільш цінним методом у вивченні поширених та рідкісних варіантів генів людини.

WES використовується для дослідження багатьох захворювань.

Застосування WES дозволило виявити варіанти певних генів, що асоціюються із очними захворюваннями. Наприклад, дегенерація

сітківки, дистрофія рогівки, порушення рефракції та різні вали розвитку очного яблука. Виявлені відмінності в організації геному створюють передумови для генетичної діагностики захворювань очей. WES при діагностиці при захворюваннях очей виявився ефективним як для діагностики менделевських хвороб, так і випадках складного генетичного захворювання. Підходить для діагностики симлексних, мультиплексу, синдромальних та несиндромальних випадках захворювань очей.

Одним із захворювань, ретельно вивченим за допомогою WES є гетерогенні дегенерації сітківки.

Сучасний арсенал молекулярної генетики має методи, що дозволяють поповнити дані щодо спадковості тієї чи іншої хвороби. До таких високопродуктивних методів відноситься **повногеномний пошук асоціацій** (genome-wide association studies, GWAS). Проте цей метод має і ряд обмежень. Він може виявити лише область геному чи локус, що асоційований із хворобою та може не встановити, який саме варіант став причиною хвороби. Цей метод спирається на загальні варіанти, чого недостатньо для пояснення більшої частини успадкованості генетичних хвороб [30].

По-перше, повногеномний пошук зв'язку в уражених сім'ях виявляє лише геномну область або локус, пов'язаний із захворюванням, і може не визначити фактичний причинний варіант. Варіанти генів, що виникли *de novo* чи відносяться до рідкісних погано досліджуються за допомогою GWAS (Frazer et al., 2009).

Уникнути таких недоліків можливо при застосуванні методу секвенуванні ДНК, він дозволяє дослідити геном чи певну його ділянку, щоб з'ясувати нуклеотидної відмінності у певних локусах

Секвенування, тобто встановлення точної повної послідовності нуклеотидів геному людини, завжди було одним із пріоритетних напрямків генетики. Завдяки секвенування стає можливим переоцінити

генетичну інформацію та охопити всі варіанти генетичних змін в межах певного локусу чи одного геному. Вивчення рідкісних причинно-наслідкових варіантів та створення персоніфікованих профілів ризику того чи іншого захворювання. Це створює передумови пошуку терапевтичних стратегій, що будуть персоніфіковані [29].

Ще одним методом, що увійшов в медичну практику завдяки NGS є PGT - **предімплантаційне генетичне тестування**. PGT застосовується для пар, які планують дитину для з'ясування ризику народження дитини з моногенною хворобою. Цей метод може бути застосований для будь якого захворювання, для якого відомий локус та механізм нуклеотидних змін. Проте, на практиці, перелік розладів, що можна діагностувати за допомогою PGT, суттєво відрізняється від країни до країни. Так, в Україні у травні 2022 цей перелік складається з 21 хвороби [20]:

1. адреногенітальний синдром.
2. Біотинідазна недостатність.
3. Вроджений гіпотиреоз.
4. Галактоземія I типу.
5. Глютарова ацидурія I типу.
6. Глютарова ацидурія II типу.
7. Дефіцит середньоланцюгової ацил-КоА-дегідрогенази (MCAD).
8. Дефіцит довголанцюгової гідроксіацил-КоА-дегідрогенази (LCHAD).
9. Дефіцит дуже довголанцюгової ацил-КоА-дегідрогенази (VLCAD).
10. Дефіцит трифункціонального білка.
11. Дефіцит HMG-ліази.
12. Ізовалеріанова ацидурія.
13. Лейциноз (хвороба «кленового сиропу»).
14. Метілмалонова ацидурія.

15. Муковісцидоз.
16. Первинний карнітиновий дефіцит.
17. Пропіонова ацидурия.
18. Спінальна м'язова атрофія.
19. Тирозинемія I типу.
20. Тяжкий комбінований імунодефіцит (SCID).
21. Фенілкетонурія та інші гіперфенілаланінемії.

Саме перехід до повного секвенування геному та подальше вирівнювання на референсний геном, що використовується NGS дозволяє суттєво скоротити час очікування відповіді для пар, що проходять передімплантаційну діагностику.

PGT використовують для біосії однієї або кількох клітин ембріонів *in vitro* (штучне запліднення), матеріал від батьків. Хоча дослідження малої кількості клітин є складною задачею, PGT виник як експериментальний метод на початку 1990-х рр. Вперше таку процедуру застосували для виявлення повторювальних У-послідовностей для з'ясування статті у сім'яз із Х-зчепленими хворобами Handyside та його колегами (1990).

Застосування PGT піднімає ряд етичних питань. Наприклад, які генетичні варіанти повинні залишатися, а які імплантуватися? В ряді країн існує законодавча база, що дозволяє регулювати випадки застосування PGT та спектр хвороб, що діагностуються. У Великобританії це Human Fertilization and Embryology Authority, у Франції - l'Agence de la Biomédecine. У Мальта та Боснії і Герцоговині застосування PGT заборонено. Головні занепокоєні навколо PGT - це страх перед евгенікою, адже знаючи алелі певних генів можна обирати бажані в ембріонах. В більшості країн евгеніка є під суворою заборонаю. Проте, існує ряд етичних питань щодо того, яку хворобу потрібно включати в PGT та, при її

наявності, елімінувати ембріони, а яку ні. Наразі застосовують наступний критерій - хвороба повинна мати чіткий фенотип, впливати на якість життя та бути дуже поширеною в популяції (наприклад, муковісцидоз, спинальна міодистрофія, гемоглобінопатія, нейрофіброматоз, хвороба Генгінгтона, м'язова дистрофія Дюшена тощо). Проведення PGT з немедичних причин (колір очей, волосся і т.д.), для встановлення статі є забороненим [14, 39].

Деякі питання є неоднозначними. Наприклад, встановлення HLA-сумісності ембріона для брата чи сестри, яким необхідна трансплантація червоного кісткового мозку. З одного боку, це шанс для врятування іншої дитини цієї пари, з іншого боку - це інструменталізація майбутньої дитини.

Для родин, в анамнезі яких є нейродегенерації із пізнім початком (наприклад, хвороба Генгінгтона), особи із груп ризику, які не хочуть знати, чи мають вони цю хворобу, проте, хочуть уникнути передачі своїм дітям, можливе проведення PGT з тестуванням на виключення. При такому тестуванні батьки не знають про наявність своєї хвороби, проте надає можливість на мати дітей з важкою нейродегенерацією. Тестування на виключення ґрунтується на виявленні маркерів гаплотипів уражених бабусь чи дідусів. Проте, такі ембріони можуть бути на 50% здоровими, в деяких країнах тестування на виключення є забороненим [34].

РОЗДІЛ 2

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНОМУ ЛЮДИНИ

2.1. Методика проведення NGS

Термін "NGS" об'єднує в собі не одну методику, а є багатоманітними пост-сенгеровськими технологіями останнього десятиліття [8, 18]. Сюди відносяться і технології sequencing-by-synthesis, sequencing-by-ligation, ion semiconductor sequencing та інші. В медицині найрозповсюдженими є sequencing-by-synthesis на пристрої Illumina, тому часто NGS асоціюється саме з Illumina (рис. 2.1).

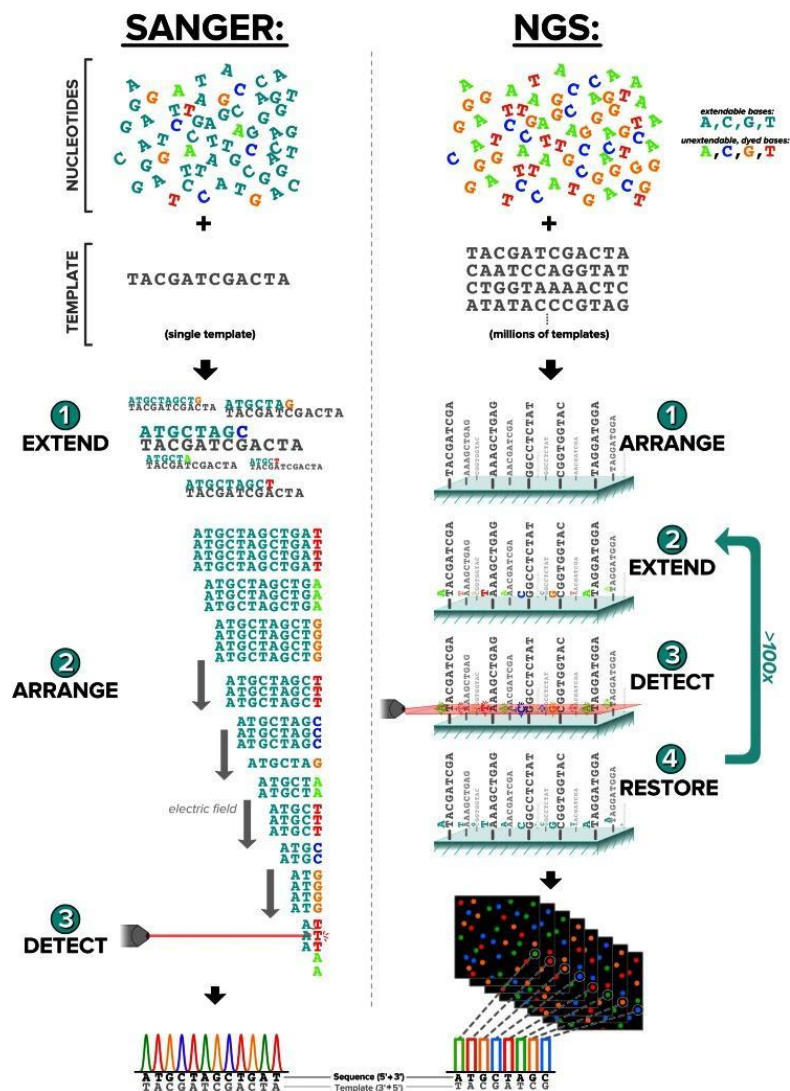


Рис. 2.1 - Порівняння секвенування за Сенгером та NGS

У спрощеному вигляді, NGS - це удосконалення та оцифроване секвенування за Сенгером. Як в NGS, так і при секвенуванні за Сенгером використовуються модифіковані флуоримцентні азотисті основи. Існує чотири типи кольорів модифікованих основ для нуклеотидів А (аденіловий), Т (тимідиловий), С (цитозиловий), G (гуаніловий). При секвенуванні за Сенгером таких основ небагато. При секвенуванні NGS модифікують всі доступні основи. В обох методах реплікація ланцюга ДНК припиняється при включенні модифікованого нуклеотида. За кольором останнього нуклеотида можна його визначити. Головна відмінність між двома методами полягає в організації самого секвенатора та детекції флуорохромного сигналу [24].



Рис. 2.2 - Методика взяття матеріалу для секвенування геному

У секвенуванні за Сенгером всі молекули ДНК розташовані в одному положенні на плоті, але мають різну довжину через різне закінчення на різних місентх нуклеотидам. Далі фрагменти

розділяють за розміром в електричному полі. Коли молекули ДНК проходять в електричному полі, спеціальний детектор вловлює інтенсивність флюорохрому та колір, створюючи серію піків, які можна інтерпретувати у послідовність нуклеотидів.

У NGS замість того, щоб розділяти в електричному полі, розділенні відбувається позиційно. Мільйони матричних ДНК розташовуються в певній позиції на предметному склі та залишаються зафіксовані в такому положенні до самого кінця секвенування. Шаблон продовжується однією модифікованою основою, колір якої фіксується мікроскопом. Далі модифіковані основи перетворюють на звичайні та відбувається наступний раунд одноосновного копіювання. Ці відмінності в методиці зчитування дають громаді відмінності у пропускній здатності. Секвенування за Сенгером розшифрує одну послідовність, а за допомогою NGS за цей час можна зробити 250 млн унікальних зчитувань. Це значить, що 100 секвенатора Сенгера, що працюють цілодобово, знадобиться 3.5 років, щоб прочитати геном людини, а лише одна машина NGS це зробить трохи більше за добу [8].

Виявлення SNP

Для того, щоб використати неймовірну кількість даних, що дає NGS, потрібне розуміння, які відмінності є клінічно значущими.

Для з'ясування значущих відмінностей у нуклеотидних послідовностях потрібно порівняти отримані за допомогою NGS дані із референтним геномом людини.

Референсний геном - це еталонний геном, послідовність якого використовується для порівняння інших геномів (рис. 2.3). З референсним геномом можна ознайомитися за посиланням

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.33. У 2023 році використовується версія геному hg38. Версія обов'язково повинна враховуватися при дослідженнях.

Навіть за наявності невідповідностей чи неточностей якість виходить високого рівня. Кількість зчитувань, що вирівняні в даній позиції називаються "охопленням" або "глибиною" прочитання. Всі відхилення від еталонної послідовності і є SNP, тобто одонуклеотидні послідовності.

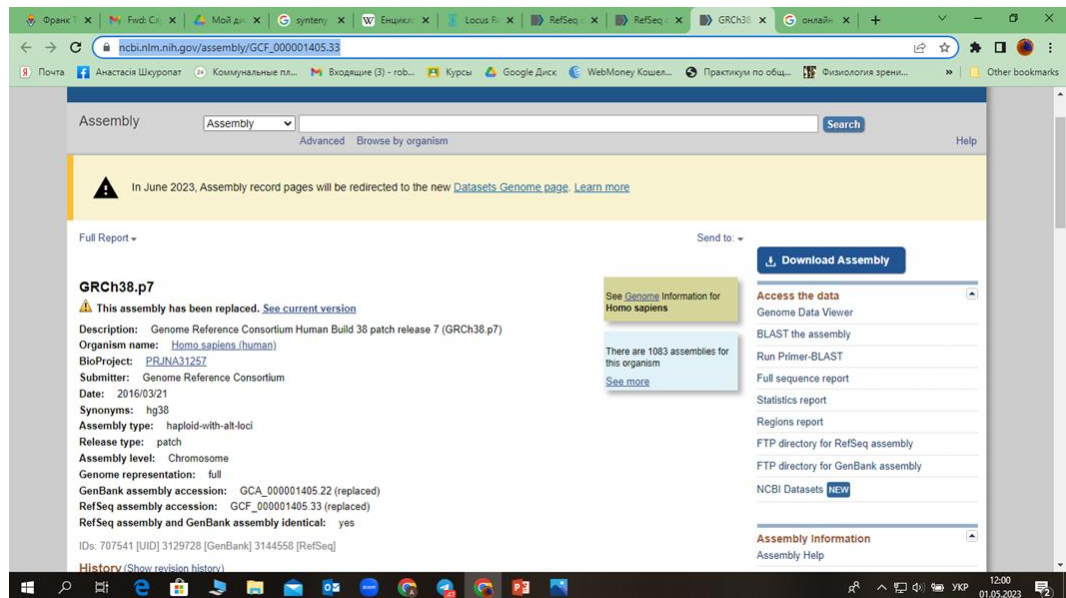


Рис. 2.3 - Референсний геном людини

Геном людини містить 3,2 млрд пар основ, але для порівняння результату NGS із референсним достатньо рідки довжиною приблизно 25 для вирівнювання [8].

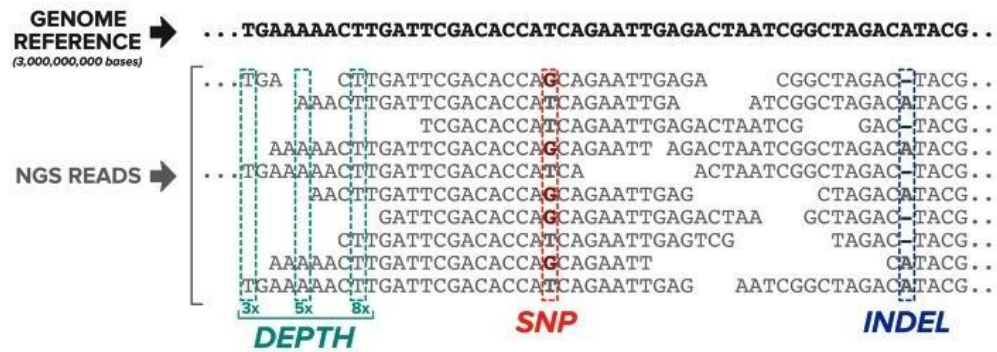


Рис. 2.4 - Встановлення SNP, делецій та інсерцій

Так, гетерозиготні SNP - це варіант, коли половина ридів відповідає еталонній послідовності, половині - ні. Вставки та делеції, що коротше за довжину риду, добре ідентифікуються при дослідженні цим методом (рис. 2.4).

Дискусійним питанням залишається глибина прочитання, тобто, скільки ридів на одну ділянку ДНК необхідно для надійного результату. Глибина покриття 5 ридів є достатньою, чи потрібно 50. Чи 1000 ридів краща за 100, чи буде в такому випадку результат надійнішим? Більшість статистичних досліджень показує, що глибина покриття 50 ридів є достатньою.

За певною статистичною обробкою за допомогою NGS можна виявити не тільки SNP та інсерції, делеції до 5 нуклеотидів, а і більш масштабні зміни геному - делеції та дуплікації сотен та тисяч нуклеотидів.

РОЗДІЛ 3

ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ЛЮДСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЇ ТА ЗВ'ЯЗОК ІЗ ХВОРОБАМИ СЕРЕДНЬОГО ВІКУ

3.1. Дослідження поліморфізму генів при онкологічних хворобах та їхнє значення

Вивчення групи генів, які приймають участь у розвитку онкологічних хвороб, необхідні для повного розуміння біології онкології, розробки нових методів лікування, методів профілактики і ранньої діагностики. Дослідження SNP дозволяють знайти варіанти тих генів, що співставляються з фенотипом онкологічних трансформацій [15, 36].

Так, було показано, що 2 несинонімічних (ті, що призводять до заміни амінокислоти в білковій послідовності) SNP у гені MMP-9 асоціюється з раком легень з метастазами (Hu et al., 2005). MMP-9 -це ген матричної металопротеїнази-9, що приймає участь у ремоделюванні міжклітинного матриксу. Було показано, що певні варіанти цього гену пов'язані із розвитком та агресією раку. У дослідженні прийняли участь 744 пацієнти з випадковим раком легень та 747 контролю. За допомогою вивчення доступної бази даних SNP (<http://pga.gs.washington.edu>) авторами дослідження було ідентифіковано три несинонімічні SNP - R279Q, P574R, і R668Q (рис.3.1). Як показано на рис. 3.1, варіант R279Q пов'язаний із заміною в 6 екзоні основи G на A, що є специфічним доменом фібронектину II типу, що призводить до підсилення зв'язування із субстратом. Варіант P574R пов'язаний із заміною у 10 екзоні C на G, варіант R668Q пов'язаний із заміною в екзоні 12 основи G на A. Це домен гемопексину, зміни в якому пов'язані із змінами у зв'язуванні субстрату та інгібітора. Отже, виявлені поліморфізми впливають на структуру білка MMP-9 та змінюють його функціональне значення [12, 22].

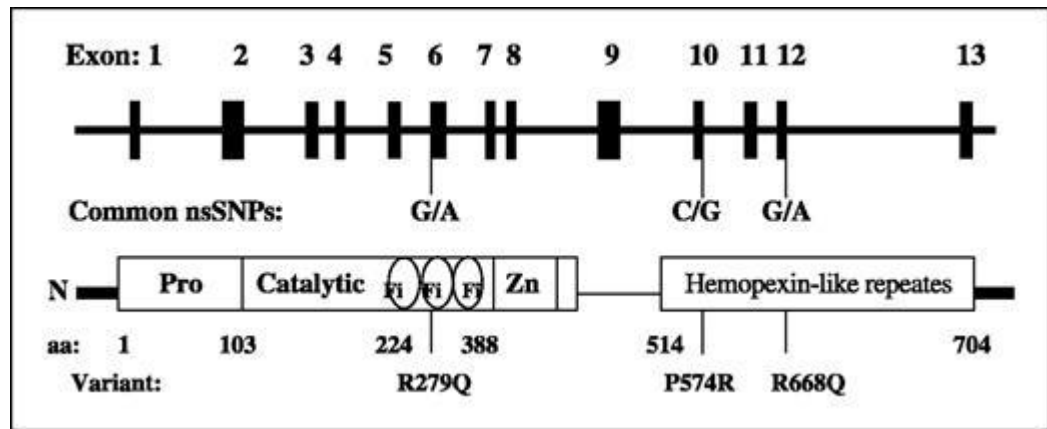


Рис. 3.1 - SNP у гені MMP-9, що асоціюються із метастазуванням первинного раку легень

Було встановлено, що поліморфізми P574R і R279Q можуть слугувати маркерами та метастазуванні первинного року легень. При варіанті R279Q позитивно заряджений аргінін замінюється на незаряджений глутамін, що змінює функціонування фермента

В іншому дослідження Leslie E Carlini та колектив (2005) вчених показали взаємозв'язок між відповіддю на лікування канецітабіном та іринотеканом метастатичних форм колоректального раку та поліморфізмом генів тимідилатсинтази, UDP-глюкуронозилтрансфераза, UGT. Автори досліджували явище токсичності, що виникає при комбінації капецітабіну та іринотекану.

У дослідженні прийняли участь 67 пацієнти з колоректальним раком, що отримали терапію канецітабіном та іринотеканом. Матеріал для дослідження геному брали з периферичної крові. Оцінювали генетичні варіації ферменту уридинфосфат-глюкуронозилтрансфераза 1-1, що кодується геном UGT1A. Цей фермент приймає участь в процесах детоксикації та сприяє перетворенню невеликих ліпофільних молекул (стероїди, білірубін, медикаменти, тощо) у водирозчинні з подальшим виведенням їх із організму [23].

Ген UGT1A має більше 100 варіантів в популяції, деякі з цих варіантів кодують фермент зі зниженою, збільшеною активністю, чи неактивний фермент.

Генотипи UGT1A7*3 та асоціювалися з низькою активністю фермента УДФ-глюкуронозилтрансфераза, що виявилось пов'язаним із значною відповіддю на протипухлинне лікування та відсутності серйозних інтоксикацій з боку шлунково-кишкового тракту. Генотип UGT1A9*22 був пов'язаний із високою активністю фермента, менш токсичною дією медичних препаратів та меншою відповіддю на лікування. Інші варіанти генотипів (UGT1A1, UGT1A6) не були пов'язані зі зниженою активністю тимідилатсинтетази, відповідно не мали потрібного відклику на терапію.

Автори дослідження роблять висновок, що дослідження варіантів генотипу з геном тимідилатсинтетази може слугувати надійним предиктором для прогнозування відклику на терапію колоректального раку канецітабіном та іринотеканом [18].

Stanulla, M. (2005) у своєму дослідженні показали, що певні варіанти гену метилтрансферази можуть бути пов'язаними із неповною ефективністю лікуванням мелкаптурином при лімфобласній анемії дітей.

Описано близька 20 алелей гену метилтрансферази (TPMT), які пов'язані зі зниженням активності ферменту. Наприклад, алелі TPMT*2, TPMT*3.

3.2. Дослідження поліморфізму генів при психіатричних хворобах та їхнє значення

Шизофренія відноситься до багатофакторних захворювань. Тобто розвиток цієї хвороби залежить від наявності певних алелей генів та оточуючого середовища. Роботою групою дослідників у психіатричному геноічному консорціумі було дослідження SNP 36989 осіб із

шизофренією та 113075 осіб контрольної групи для встановлення тієї групи генів та їхніх алелей, що відіграють важливу роль при розвитку хвороби [35].

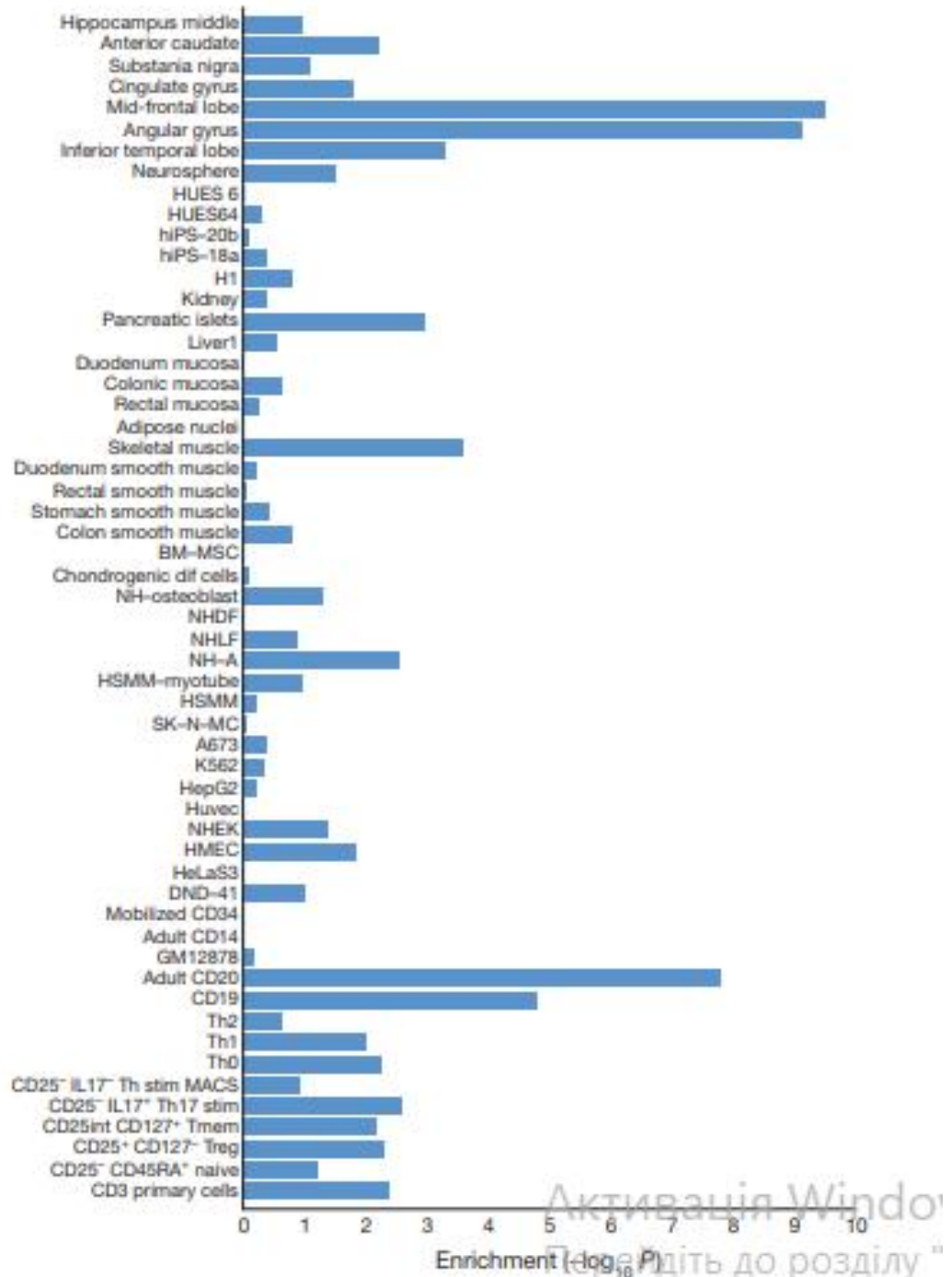


Рис.3.2 - гени, що експресуються в головному мозку та імунній системі та мають алелі, пов'язані із розвитком шизофренії

Джерело: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25056061/#&gid=article-figures&pid=extended-data-figure-4-uid-3>

Автори виявили 108 SNP, які були пов'язані із розвитком шизофренії, при чому, для 83 SNP було вперше встановлено взаємозв'язок із захворюванням. Більшість генів, що асоціювалися із розвитком хвороби відносяться до специфічних генів, що експресуються в клітинах головного мозку (рис. 3.2).

Наприклад, ген DRD-2 залучені до глутоматергічної нейротрансмісії (рис.3.3). Терапевтичною мішенню якраз і є цей ген. Отримані результати поліморфізму генів узгоджуються із концепцією патофізіологічного розвитку шизофренії. Для дослідження використали методика GWAS. Для з'ясування наявності SNP була використана база даних повних геномів 1000 Genomes Project (<https://www.internationalgenome.org/>).

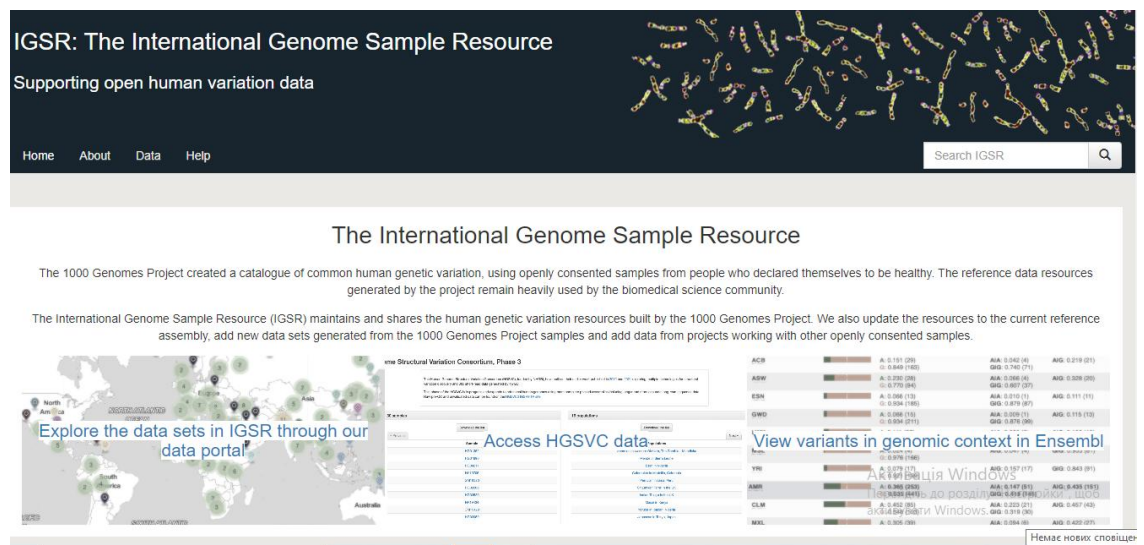


Рис. 3.3 - головна сторінка 1000 Genomes Project

Окрім специфічних генів, що експресуються в головному мозку, виявлені були SNP в генах, що пов'язані із імунною системою. Авторі припускають, що імунна система також відіграє роль у формуванні шизофренії. До даного дослідження не використовувався метод

повногеномного пошуку асоціацій GWAS, досліджувався тільки екзом [26].

Із 108 знайдених SNP 75% були генами, що кодують білки, 8% знахідок не розташовувалися в гені, але, очевидно, впливають на його експресію. Тобто, за допомогою методу GWAS були знайдені SNP у некодуючій ділянці. 56 SNP були знайдені в енхансерах генів (рис. 3.4).

Було показано, що гени, які кодують субодиниці енергозалежного кальцієвого каналу *CACNA1C*, *CACNB2* і *CACNA1* також мають SNP, з якими асоціювався розвиток шизофренії. Кальцієві канали задіяні в механізмах глутаматергічної нейротрансмісії та синаптичної пластичності. Була показана асоціація між розвитком шизофренії та диференціювання В-лімфоцитів CD19 та CD20. Епідеміологічні спостереження захворюваності на шизофренію давно вказували зв'язок між її виникненням та імунної системи.

Цікавим є те, що багато із знайдених генів, SNP яких асоціювалися із шизофренією, пов'язані і із розладами аутичного спектру та розумовою відсталістю. Це вказує, що виникнення цих психічних розладів може мати схожий патогенез.

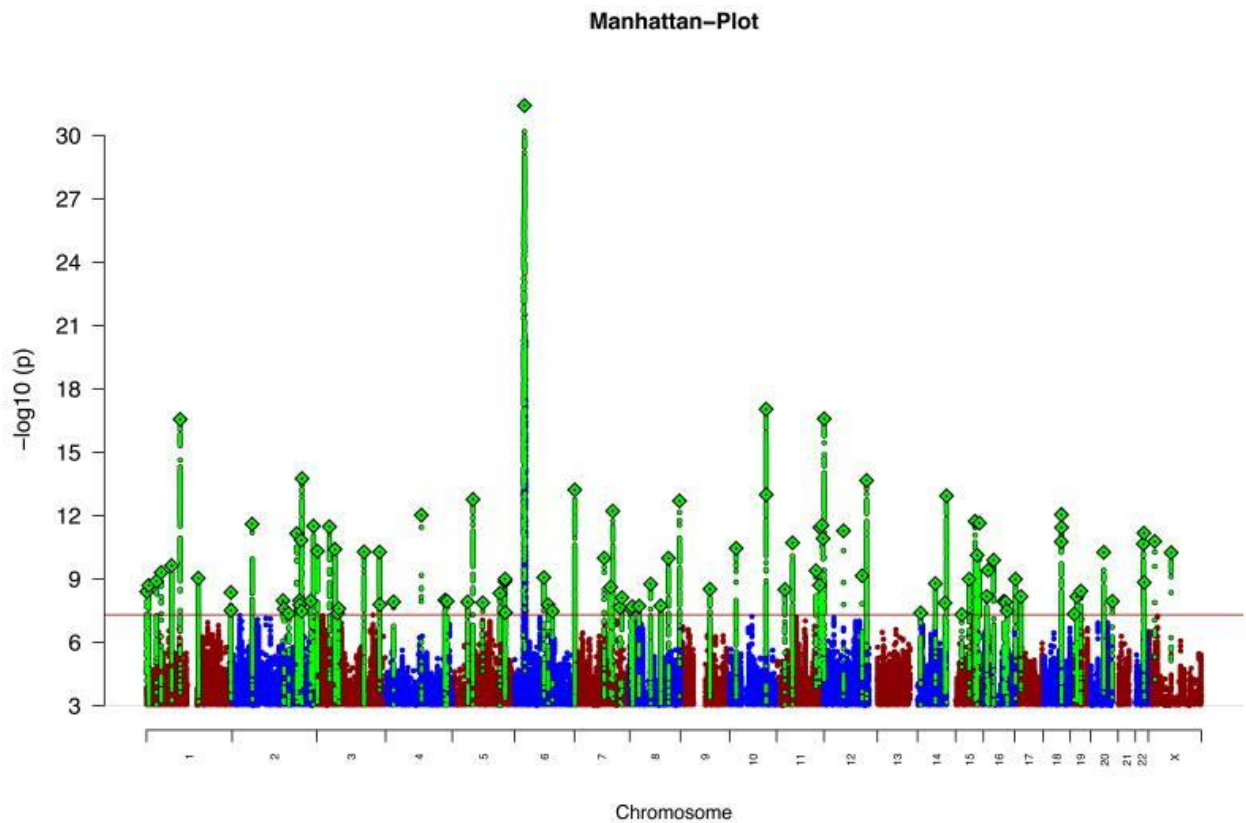


Рис.3.4 - Manhattan plot, що демонструє наявність SNP у геномі. По вісі x позначені різні хромосоми, во вісі y - значимість отриманого результату $-\log_{10}(p)$. Зеленим позначені SNP.

Джерело: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25056061/#&gid=article-figures&pid=extended-data-figure-4-uid-3>

3.3. Дослідження поліморфізму генів при серцево-судинних хворобах та їхнє значення

Дослідження **ішемічної хвороби серця** показало, що ця хвороба є результатом гіперхолестеринемії. Є кілька станів, які призводять до гіперхолестеринемії. У розвитку гіперхолестеринемії відіграє роль ген аполіпротеїну E - ApoE, гени рецепторного комплексу, який інтерналізує ліпопротеїни низької щільності - OLR1. Комбінація певних варіантів цього гену призведе до надмірного утворення

ліпопротеїнів низької щільності у великій кількості. Проте, для розвитку цієї хвороби необхідний середовищний фактор - велика кількість насичених жирів в харчовому раціоні [38].

Гіперхолестеринемія також виникає у людей, що мають особливість гену ApoB-100 - SNP R3500Q, тобто заміну глутаміну на арінін в 3500 положенні.

Також, було показано, що ішемічна хвороба серця пов'язана із високим рівнем гомоцистеїну. В свою чергу гіпергомоцистеїнемія пов'язана із SNP гену метилтетрогідрофолату (MTHFR) C677T (у 677-му положенні відбувається заміна цитозину на тимін). Це призводить до амінокислотної заміни валіна на аланін. Білок стає менш термостабільним. Такий SNP зустрічається в популяції європейців у 15%. Цікаво, що цей самий SNP асоціюється із дефектом закриття нервової трубки. Жінки, що є гетерозиготами за цим алелем, мають вище у 7,2 разів ризик народження дітей із вадами нервової трубки - аненцефалія, черепно-мозкові грижі [38].

Akhter M. S. та колегами було показано, що ішемічний інсульт також має певні поліморфізми генів, що асоціюються із частотою його виникнення. Вони досліджували SNP гена GPx-3 (плазмової глутатіон пероксидази). GPx-3 є потужним антиоксидантом. Однією із причин ішемічного інсульту в науковій літературі розглядають зсув балансу антиоксидантів/оксидантів в бік оксидантів. Це призводить до зсуву кровоспинної здатності крові. Зсув у окисний стан є однією із ланкою патогенезу венозного тромбозу. Це спричинює збільшення агрегаційної здатності тромбоцитів, розвиток атеросклерозу, що може стати причиною ішемічного інсульту [29].

GPx-3 є антиоксидантом, що поглинає активні форми кисню та, через підтримку біодоступності NO, сприяє вазодилатації судин та пригнічує агрегаційну здатність тромбоцитів. Зниження активності GPx-3 було пов'язано із розвитком ішемічного інсульту (рис. 3.5).

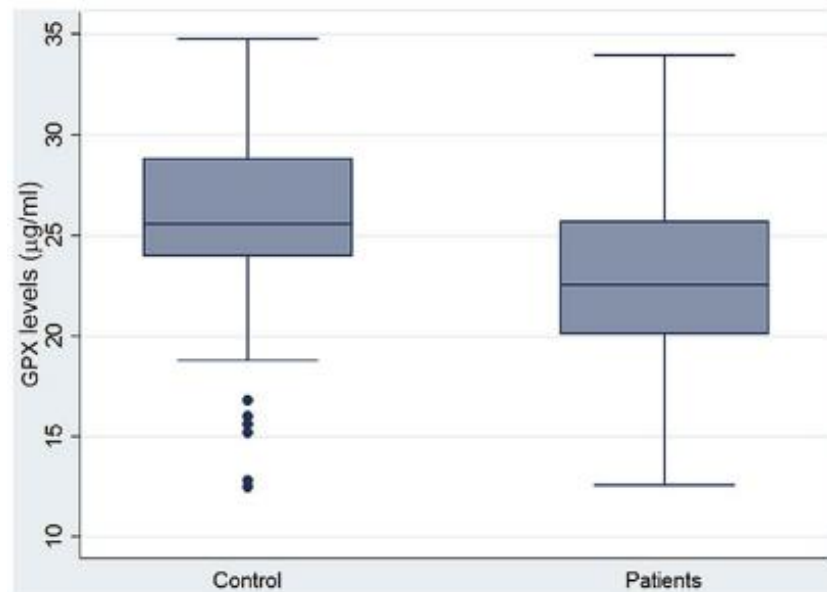


Рис. 3.5 - Boxplot, що ілюструє активність глутатіон пероксидази (GPx-3) у контрольній групі та осіб, що перенесли ішемічний інсульт
джерело: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25126700/>

Автори дослідження провели генотипування гену GPx-3 та встановили наявність 7 SNP. Це такі варіанти 2942A/C, 2927T/C, 2861A/T, 2568T/C, 2518T/C, 2284T/A та 265C/T. Всі вони локалізувалися в ділянці промотора. Серед усіх SNP 2861A/T продемонстрував значну частоту та асоціацію із ішемічним інсультом. Особи, що мали в 2861 положенні нуклеотид Т замість А, і були гомозиготними за цим алелем, мали рівень GPx-3 в 4 рази менший за контрольну групу.

SNP 2568T/C також мав асоціацію із ішемічним інсультом, проте меншу ніж 2861A/T. Проте носії мутації заміни Т на С у 2568 положенні мали знижений рівень GPx-3. SNP 265C/T також продемонстрував зв'язок зі зниженим рівнем GPx-3. Так, носії алеля з заміною С на Т у 265 положенні мали знижений рівень GPx-3 [27].

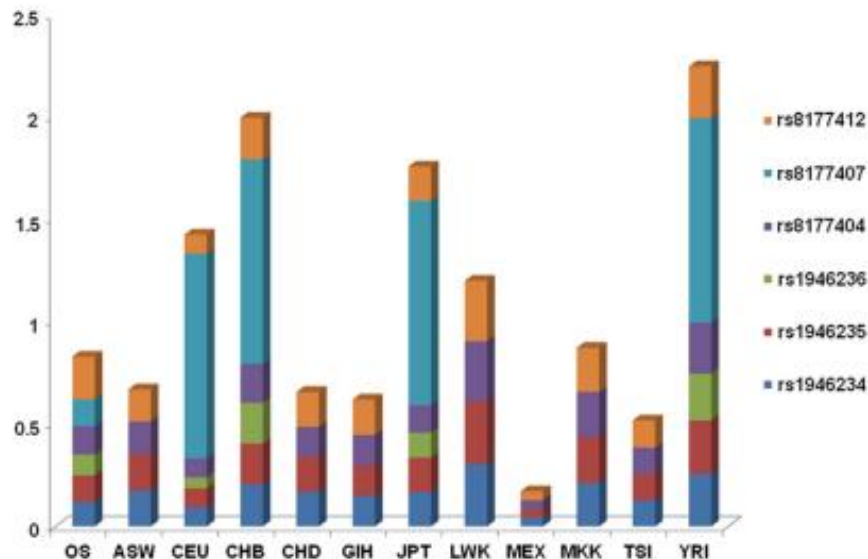


Рис. 3.6 - Розповсюдженість SNP гена *GRX-3* в різних популяціях

Примітка: по вісі x - ASW - південно-західна Африка, CEU - жителі Юти із північно- та західноєвропейським походженням, CHB - китайці із Пекіну, CHD - китайці із Денверу, GIH - індіанці гуджараті в Х'юстоні, JPT - японці, LWK - кенійці, TSI - тосканці, Італія, YRI - нігерійці

по вісі y - 2518T/C - rs8177407, 2942A/C - rs1946234, 2927T/C - rs1946235, 2861A/T - rs1946236, 2568T/C - rs8177404, 2518T/C - rs8177407, 265C/T - rs8177412.

джерело: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25126700/>

Дослідження такої хвороби середнього віку як **гіпертонії** показало, що в її розвитку приймають участь кілька локусів та мають значення середовищні фактори (наприклад, високий вміст солі у харчовому раціоні, переїдання, гіподинамія, споживання алкоголю, психоемоційні стреси). Дослідники приділили увагу генам, що експресують білки ренин-ангіотензивної системи. До основних ланок належать ренин, ангіотензин, АПФ (ангіотензинперетворювальний фермент), ангіотензинові рецептори, ферменти біосинтезу стероїдів. Кожен з цих елементів може бути закодований кількома різними алелями, відмінними за своєю активності, здатністю зв'язуватися із субстратом, швидкістю протікання реакції тощо [38].

Наприклад, один із ключових елементів для формування гіпертонічної хвороби є ангіотензин. Ангіотензин синтезується у вигляді попередника - ангіотензиногену. Ангіотензиноген є неактивним та перетворюється на ангіотензин під дією реніну та ангіотензинперетворювального ферменту. В подальшому, активований ангіотензин зв'язується із рецепторами та звужує судини, збільшує синтез альдостерону. Ген ангіотензин (AGT) має понад 15 поліморфізмів. Найзначущим у патогенезі гіпертонії виявився SNP, що призводить до вставки у 235-ому положенні амінокислоти метіонін чи треонін (M235T). При чому, в популяції зустрічаються гомозиготи TT (тобто, їхній ангіотензин містить у 235-му положенні треонін), гомозиготи MM (тобто, їхній ангіотензин містить у 235-му положенні метіонін), гетерозиготи MT (тобто, їхній ангіотензин містить у 235-му положенні метіонін або треонін). Алель, що кодує вставку треоніна (T), кодує ангіотензин, що на 20% активніший, ніж алель M (кодує вставку метіоніну). Відповідно, гомозиготи за алелем T мають на 20% вищий ризик розвитку гіпертонії, порівняно із гомозиготами M [38].

Ген, що кодує ангіотензинперетворюючий фермент, теж має поліморфізми. Виділяють форму I, що у 16-ому інтроні має Alu-повтор довжиною 287 п.н. та форму D, що не має такої вставки. Гомозиготи за алелем D мають ангіотензинперетворюючий фермент вдвічі активніший за гомозигот за алелем I. З алелем D асоціюється вищий ризик розвитку ряду серцево-судинних патологій - артеріальна гіпертензія, діабетична нефропатія, гіпертрофія лівого шлуночку, інфаркт міокарду. Частота алеля D у гомозиготному стані в популяції європейців складає близько 30%.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено на основі аналізу літературних джерел, що ефективними методами дослідження поліморфізму геномної людської популяції є NGS (next generation sequencing), що лягло в основу повноекзомного секвенування, повногеномного пошуку асоціацій та пренатальної діагностики спадкових розладів.
2. З'ясовано, що при застосуванні терапевтичних препаратів при колоректальному раку, відгук на лікування та ускладнення від лікування залежать від різних алелей гену матриксної металопротеїнази-9.
3. Вивчено, що розвиток психіатричного розладу залежить від комбінації 108 алелей генів, що специфічно експресуються в головному мозку та імунній системі.
4. З'ясовано, що такі хвороби середнього віку, як ішемічна хвороба серця, ішемічний інсульт, гіпертонія мають генетичне підґрунтя і асоційовані із певними алелями генів, що може лягти в основу прогнозування виникнення того чи іншого патологічного стану.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D et al (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467(7319):1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
2. Aghabozorg Afjeh SS, Ghaderian SM, Mirfakhraie R, Piryaei M, Zaim Kohan H. Association Study of rs3184504 C>T Polymorphism in Patients With Coronary Artery Disease. *Int J Mol Cell Med*. 2014 Summer;3(3):157-65. PMID: 25317402; PMCID: PMC4170489.
3. Akhter MS, Biswas A, Rashid H, Devi L, Behari M, Saxena R. Screening of the GPX3 gene identifies the "T" allele of the SNP - 861A/T as a risk for ischemic stroke in young Asian Indians. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 Sep;23(8):2060-2068. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2014.03.010. Epub 2014 Aug 8. PMID: 25126700.
4. Boroujeni PB, Ebrahimian S, Abedini M, Chayjan MR, Hassani M, Gourabi H, Sadighi-Gilani MA, Sabbaghian M, Meybodi AM. The role of DEFB126 variation in male infertility and medically assisted reproduction technique outcome. *Reprod Biomed Online*. 2019 Oct;39(4):649-657. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.05.012. Epub 2019 May 21. PMID: 31474436.
5. Carlini LE, Meropol NJ, Bever J, Andria ML, Hill T, Gold P, Rogatko A, Wang H, Blanchard RL. UGT1A7 and UGT1A9 polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1226-36. PMID: 15709193.
6. Cheng J, Liu J, Li X, Peng J, Han S, Zhang R, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor polymorphism and ischemic stroke: a case–

- control study in Chinese population. *Acta Neurol Scand* (2008) 118:333–8. 10.1111/j.1600-0404.2008.01040.x
7. De Rycke M, Berckmoes V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. *Genes (Basel)*. 2020 Jul 31;11(8):871. doi: 10.3390/genes11080871. PMID: 32752000; PMCID: PMC7463885.
 8. Dehghan A. Genome-Wide Association Studies. *Methods Mol Biol*. 2018;1793:37-49. doi: 10.1007/978-1-4939-7868-7_4. PMID: 29876890.
 9. Duan S, Shi C, Chen G, Zheng JF, Wu B, Diao H, Ji L, Gu Y, Xin A, Wu Y, Zhou W, Miao M, Xu L, Li Z, Yuan Y, Wang P, Shi H. Another functional frame-shift polymorphism of DEFB126 (rs11467497) associated with male infertility. *J Cell Mol Med*. 2015 May;19(5):1077-84. doi: 10.1111/jcmm.12502. Epub 2015 Feb 27. PMID: 25721098; PMCID: PMC4420609.
 10. Engle LJ, Simpson CL, Landers JE. Using high-throughput SNP technologies to study cancer. *Oncogene*. 2006 Mar 13;25(11):1594-601. doi: 10.1038/sj.onc.1209368. PMID: 16550159.
 11. Fiatal S, Ádány R. Application of Single-Nucleotide Polymorphism-Related Risk Estimates in Identification of Increased Genetic Susceptibility to Cardiovascular Diseases: A Literature Review. *Front Public Health*. 2018 Jan 31;5:358. doi: 10.3389/fpubh.2017.00358. PMID: 29445720; PMCID: PMC5797796.
 12. Flores AE, Pascotini ET, Kegler A, Broetto N, Gabbi P, Duarte T, Prado ALC, Duarte MMMF, da Cruz IBM, Dos Santos ARS, Royes LFF, Figuera MR. Worst spasticity in patients post-stroke associated with MNSOD ALA16VAL polymorphism and interleukin-1 β . *Gene*. 2022 Dec 30;847:146880. doi: 10.1016/j.gene.2022.146880. Epub 2022 Sep 11. PMID: 36100117.
 13. Gupta S, Chatterjee S, Mukherjee A, Mutsuddi M. Whole exome sequencing: Uncovering causal genetic variants for ocular diseases.

- Exp Eye Res. 2017 Nov;164:139-150. doi: 10.1016/j.exer.2017.08.013. Epub 2017 Aug 24. PMID: 28844620.
14. Hansen PS. Familial defective apolipoprotein B-100. *Dan Med Bull*. 1998 Sep;45(4):370-82. PMID: 9777289.
15. He X, Li X, Du X, Han J, Zhang H, Zhu Y, Ma H. Rs420137, rs386360 and rs7763726 polymorphisms in fibronectin type III domain containing 1 are associated with susceptibility to coronary heart disease: Analysis in the Han population. *Front Cardiovasc Med*. 2022 Oct 6;9:964978. doi: 10.3389/fcvm.2022.964978. PMID: 36277792; PMCID: PMC9583258.
16. Hiura Y, Shen CS, Kokubo Y, Okamura T, Morisaki T, Tomoike H, et al. Identification of genetic markers associated with high-density lipoprotein-cholesterol by genome-wide screening in a Japanese population: the Suita study. *Circ J* (2009) 73:1119–26. 10.1253/circj.CJ-08-1101
17. Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y et al. (2005b). *Clin Cancer Res* 11: 5433–5439
18. Humphries SE, Talmud PJ. Hyperlipidaemia associated with genetic variation in the apolipoprotein B gene. *Curr Opin Lipidol*. 1995 Aug;6(4):215-22. doi: 10.1097/00041433-199508000-00005. PMID: 7670750.
19. Kalina A, Császár A, Czeizel AE, Romics L, Szabóki F, Szalai C, Reiber I, Németh A, Stephenson S, Williams RR. Frequency of the R3500Q mutation of the apolipoprotein B-100 gene in a sample screened clinically for familial hypercholesterolemia in Hungary. *Atherosclerosis*. 2001 Jan;154(1):247-51. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00648-1. PMID: 11137107.
20. Lencz, T. et al. Genome-wide association study implicates NDST3 in schizophrenia and bipolar disorder. *Nature Commun*. 4, 2739 (2013)

21. Lian J, Huang Y, Huang RS, Xu L, Le Y, Yang X, Xu W, Huang X, Ye M, Zhou J, Duan S. Meta-analyses of four eosinophil related gene variants in coronary heart disease. *J Thromb Thrombolysis*. 2013 Nov;36(4):394-401. doi: 10.1007/s11239-012-0862-z. PMID: 23328882.
22. Liu Y, Niu W, Wu Z, Su X, Chen Q, Lu L, Jin W. Variants in exon 11 of MEF2A gene and coronary artery disease: evidence from a case-control study, systematic review, and meta-analysis. *PLoS One*. 2012;7(2):e31406. doi: 10.1371/journal.pone.0031406. Epub 2012 Feb 21. PMID: 22363637; PMCID: PMC3283621.
23. Lu Y, Yuan W, Wang L, Ning M, Han Y, Gu W, Zhao T, Shang F, Guo X. Contribution of lncRNA CASC8, CASC11, and PVT1 Genetic Variants to the Susceptibility of Coronary Heart Disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021 Jun 1;77(6):756-766. doi: 10.1097/FJC.0000000000001019. PMID: 34001726.
24. MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, Stine OC, Giles WH, O'Connell JR, et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: the Stroke Prevention in Young Women study. *Stroke* (2009) 40:e550–7. 10.1161/STROKEAHA.109.557462
25. Muzzey D, Evans EA, Lieber C. Understanding the Basics of NGS: From Mechanism to Variant Calling. *Curr Genet Med Rep*. 2015;3(4):158-165. doi: 10.1007/s40142-015-0076-8. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26566462; PMCID: PMC4633438.
26. National Human Genome Research Institute. The Human Genome Project Completion: frequently asked questions [Internet]. genome.gov. <https://www.genome.gov/11006943>. Cited 29 April 2015.
27. Orou A, Fechner B, Utermann G, Menzel HJ. Allele-specific competitive blocker PCR: a one-step method with applicability to

- pool screening. *Hum Mutat.* 1995;6(2):163-9. doi: 10.1002/humu.1380060209. PMID: 7581400.
28. Rexrode KM, Ridker PM, Hegener HH, Buring JE, Manson JE, Zee RY. Genetic variation of the androgen receptor and risk of myocardial infarction and ischemic stroke in women. *Stroke* (2008) 39:1590–2. 10.1161/STROKEAHA.107.508218
29. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014 Jul 24;511(7510):421-7. doi: 10.1038/nature13595. Epub 2014 Jul 22. PMID: 25056061; PMCID: PMC4112379.
30. Shkuropat, A. V. (2018). Coherent relations in EEGs of adolescents with partial hearing loss under conditions of an orthostatic test. *Neurophysiology*, 50(5), 365-371.
31. Shkuropat, A. V., Shvets, V. A., Golovchenko, I. V., & Prosiannikova, Y. M. (2022). Influence of biologically active substances on synthesis function and cellular destruction of hepatocytes in vitro.
32. Shvets, V. A., & Shkuropat, A. V. (2020). Effect of interleukin-2 on antioxidant system and lipid peroxidation during physical activity. *Cherkasy University Bulletin: Biological Sciences Series*, (2), 107-115.
33. Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, Cario G, Schrauder A, Zimmermann M, Welte K, Ludwig WD, Bartram CR, Zanger UM, Eichelbaum M, Schrappe M, Schwab M. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2005 Mar 23;293(12):1485-9. doi: 10.1001/jama.293.12.1485. PMID: 15784872.
34. V. Shvets, A. Shkuropat, Y. Prosiannikova, I. Golovchenko. Effect of Interleukin-2 on the humoral link of immunity during physical activity // *Journal of Physical Education and Sport*® (JPES), Vol 20

(Supplement issue 6), Art 427 pp 3153 – 3159, 2020 online ISSN: 2247 - 806X; p-ISSN: 2247 – 8051; ISSN - L = 2247 – 8051
<https://efsupit.ro/images/stories/noiembrie2020/Art%20427.pdf>.

35. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Benke KS, Kenet G, Simioni P, Ottaviano F, Damasceno BP, Annichino-Bizacchi JM, Handy DE, Loscalzo J. Promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene: a novel risk factor for arterial ischemic stroke among young adults and children. *Stroke*. 2007 Jan;38(1):41-9. doi: 10.1161/01.STR.0000252027.53766.2b. Epub 2006 Nov 22. PMID: 17122425; PMCID: PMC1781064.
36. Voetsch B, Jin RC, Bierl C, Deus-Silva L, Camargo EC, Annichino-Bizacchi JM, Handy DE, Loscalzo J. Role of promoter polymorphisms in the plasma glutathione peroxidase (GPx-3) gene as a risk factor for cerebral venous thrombosis. *Stroke*. 2008 Feb;39(2):303-7. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.490094. Epub 2007 Dec 20. PMID: 18096833.
37. Yue, W. H. et al. Genome-wide association study identifies a susceptibility locus for schizophrenia in Han Chinese at 11p11.2. *Nature Genet*. 43, 1228–1231 (2011)
38. Медична генетика: Підручник для вузів / В. М. Запорожан, Ю. І., Бажора, А. В. Шевеленкова, М. М. Чеснокова. — Одеса: Одес. держ. мед. ун-т, 2005. — 260 с. — (Б-ка студента-медика). ISBN 966-7733-66-1
39. Шкуропат, А. В. (2015). Зміни інтенсивності електрогенезу ритмів ЕЕГ приглухуватих підлітків під час вирішення логічних задач. *Природничий альманах. Сер.: Біологічні науки*, (22), 105-114.