

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ В ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ АССОЦИИРОВАННЫХ С МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПОЛИМОРФИЗМОВ

*Айбазов А.С.-Х., Беитоев А.Х.*

*СПб ГБУЗ Клиническая больница Святителя Луки,*

*Санкт-Петербург, Россия;*

*aaibaz0v81@yandex.ru*

**Введение.** Мочекаменная болезнь (МКБ) является распространенным заболеванием, в развитии которого важную роль играет генетическая предрасположенность. Современная молекулярная диагностика требует высокочувствительных методов, и одним из перспективных направлений считается использование систем CRISPR-Cas для детекции единичных нуклеотидных замен. Данная работа была направлена на оценку возможности применения различных Cas-нуклеаз для выявления полиморфизмов в генах VDR, CALCR, TRPV5 и RGS14, ассоциированных с риском развития МКБ.

**Цель исследования.** Целью работы была разработка подхода для детекции полиморфизмов генов VDR, CALCR, TRPV5 и RGS14 с использованием систем CRISPR-Cas. Для этого необходимо было подобрать оптимальные Cas-нуклеазы с специфичными PAM-последовательностями, разработать гидовые РНК и создать синтетические ДНК-мишени, моделирующие варианты полиморфизмов, а также провести тестирование эффективности и специфичности подобранных нуклеаз в условиях *in vitro*.

**Материалы и методы.** В работе исследовались полиморфизмы генов VDR, CALCR, TRPV5 и RGS14. Были отобраны Cas-нуклеазы с различными PAM-мотивами: SpCas9, CcCas9, CoCas9 и PpCas9. Для них разработали и синтезировали методом *in vitro* транскрипции соответствующие гидовые РНК. Методами ПЦР с использованием специально сконструированных праймеров были получены синтетические ДНК-мишени, имитирующие участки генома человека с «диким типом» и «мутантными» вариантами. Активность и специфичность Cas-нуклеаз оценивали в реакциях *in vitro* расщепления с последующим анализом продуктов методом электрофореза в агарозном геле.

**Результаты исследования.** В результате работы для каждого полиморфизма были подобраны потенциально пригодные Cas-нуклеазы, успешно синтезированы гидовые РНК и созданы синтетические ДНК-мишени. Тестирование *in vitro* показало возможность специфической детекции двух из четырех полиморфизмов. Для полиморфизма VDR нуклеазы CcCas9 и CoCas9 показали специфичное расщепление «мутантного» аллеля, а для полиморфизма TRPV5 нуклеаза PpCas9 эффективно детектировала определенные нуклеотидные замены. Для полиморфизмов CALCR и RGS14 подобранные нуклеазы не продемонстрировали требуемой специфичности.

**Выводы.** Проведенная работа подтвердила принципиальную возможность применения систем CRISPR-Cas для детекции генетических полиморфизмов, связанных с МКБ. Разработанный подход, включающий подбор нуклеаз, дизайн

гидовых РНК и создание синтетических ДНК-мишеней, показал свою эффективность для полиморфизмов в генах VDR и TRPV5. Полученные результаты являются основой для дальнейшей разработки диагностической панели для оценки генетической предрасположенности к мочекаменной болезни.

### *Литература*

1. Метаболические факторы риска и формирование мочевых камней. Исследование V: Избыточный вес и ожирение как метаболические факторы литогенеза / С. А. Голованов, М. Ю. Просяников, А. Д. Каприн [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2021. – Т. 14, № 4. – С. 80–89.

2. Метаболические факторы риска и формирование мочевых камней. Исследование VI: Литогенная активность кальциурии у мужчин и женщин / С. А. Голованов, М. Ю. Просяников, А. В. Сивков [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2023. – Т. 16, № 1. – С. 80–89.

3. Association of TRPV5, CASR, and CALCR genetic variants with kidney stone disease susceptibility in Egyptians through main effects and gene-gene interactions / F. T. Ali, E. M. A. El-Azeem, H. F. A. Hekal [et al.] // Urolithiasis. – 2022. – Vol. 50, № 6. – P. 701–710.

4. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau [et al.] // Science. – 2007. – Vol. 315, № 5819. – P. 1709–1712.

5. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III / E. Deltcheva, K. Chylinski, C. M. Sharma [et al.] // Nature. – 2011. – Vol. 471, № 7340. – P. 602–607.

## **GENETIC DIAGNOSTICS OF UROLITHIASIS-ASSOCIATED POLYMORPHISMS USING SYNTHETIC TARGETS**

*Aybazov A.S.-Kh., Beshtoev A.Kh.*

*Clinical Hospital of St. Luke, St. Petersburg, Russia*

*aaibaz0v81@yandex.ru*

This study aimed to develop a CRISPR-Cas-based approach for detecting polymorphisms in the VDR, CALCR, TRPV5, and RGS14 genes associated with urolithiasis risk. Several Cas nucleases were screened in vitro, demonstrating successful and specific detection of polymorphisms in the VDR and TRPV5 genes. The results confirm the feasibility of using CRISPR-Cas systems as a basis for developing a diagnostic panel for genetic predisposition to kidney stone disease.