

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



Шахтшнейдер Елена Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ
ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ В ЕВРОПЕОИДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ СИБИРИ**

1.5.7 Генетика

3.1.20 Кардиология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН
Воевода Михаил Иванович

Новосибирск – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	22
1.1 Нарушения обмена липидов	23
1.2 Молекулярно-генетические основы развития гиперлипидемии.....	26
1.3 Роль генов <i>ABCA1</i> , <i>APOA1</i> , <i>APOB</i> , <i>APOC3</i> , <i>APOE</i> , <i>CETP</i> , <i>CLPS</i> , <i>LDLR</i> , <i>LPL</i> , <i>SCARB1</i> и <i>SREBF2</i> в липидном обмене.....	27
1.3.1 Ген <i>ABCA1</i>	27
1.3.2 Ген <i>APOA1</i>	30
1.3.3 Ген <i>APOB</i>	35
1.3.4 Ген <i>APOC3</i>	37
1.3.5 Ген <i>APOE</i>	38
1.3.6 Ген <i>CETP</i>	43
1.3.7 Ген <i>CLPS</i>	44
1.3.8 Ген <i>LDLR</i>	44
1.3.9 Ген <i>LPL</i>	46
1.3.10 Ген <i>SCARB1</i>	47
1.3.11 Ген <i>SREBF2</i>	48
1.4 Генетические детерминанты субфракций липопротеинов низкой плотности	49
1.5 Семейная гиперхолестеринемия.....	51
1.6 Методы высокотехнологичного секвенирования в изучении молекулярно-генетических детерминант гиперхолестеринемии	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	65
2.1 Общая характеристика обследованных групп	65
2.1.1 Популяционная группа взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия)	67

2.1.2 Выборка для прямого автоматического секвенирования промотора и экзонов гена <i>LDLR</i>	70
2.1.3 Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией	71
2.1.4 Выборка лиц с коронарным атеросклерозом	75
2.2 Гистологическое исследование фрагментов атеросклеротических бляшек	76
2.3 Исследование субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности.....	78
2.4. Молекулярно-генетические методы исследования.....	78
2.4.1 Выделение ДНК и РНК.....	79
2.4.2 Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов генов липидного обмена.....	81
2.4.3 Прямое автоматическое секвенирование гена <i>LDLR</i>	82
2.4.4 Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов липидного обмена.....	83
2.4.5 MLPA анализ у пациентов с семейной гиперхолестеринемией.....	84
2.4.6 Полногеномное секвенирование ДНК в группе пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии	85
2.4.7 Полноэкзомное секвенирование ДНК в группе пациентов с коронарным атеросклерозом.....	86
2.4.8 Полногеномное секвенирование РНК в группе пациентов с коронарным атеросклерозом.....	87
2.5 Статистический анализ.....	88
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	90
3.1 Распространенность аллелей и генотипов однонуклеотидных вариантов в генах, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии, в популяционной группе Западной Сибири	90

3.2 Результаты анализа спектра вариантов гена <i>LDLR</i> в популяционной группе с гиперхолестеринемией и группе с нормальными и низкими значениями ОХС.....	98
3.3 Анализ ассоциации вариантов генов липидного метаболизма с рядом биохимических показателей крови.....	102
3.3.1 Варианты rs429358 и rs7412 гена <i>APOE</i>	102
3.3.2 Вариант rs708272 гена <i>CETP</i>	105
3.3.3 Вариант rs320 гена <i>LPL</i>	108
3.3.4 Вариант rs5888 гена <i>SCARB1</i>	109
3.4 Генетические компоненты формирования промежуточных фракций липопротеинов низкой плотности	111
3.5 Анализ генов, ассоциированных с семейной гиперхолестеринемией, методами высокопроизводительного секвенирования и мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб	116
3.5.1 Редкие варианты в гене <i>LDLR</i> у пациентов с семейной гиперхолестеринемией.....	117
3.5.2 Клинические случаи: компаунд гетерозиготы в гене <i>LDLR</i>	119
3.5.3 Клинический случай: редкий вариант в регуляторном районе гена <i>LDLR</i>	120
3.5.4 Клинический случай: диагностика гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии в молодом возрасте	122
3.5.5 Определение делеций и дупликаций в гене <i>LDLR</i> методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA).....	124
3.5.6 Редкие варианты в гене <i>APOB</i> у пациентов с семейной гиперхолестеринемией	125
3.5.7 Варианты в гене <i>PCSK9</i>	127
3.5.8 Варианты в гене <i>LDLRAP1</i>	129
3.5.9 Редкие варианты в генах <i>ABCG5</i> , <i>APOC3</i> , <i>LPL</i> , <i>SREBF1</i> у пациентов с семейной гиперхолестеринемией	129

3.5.10 Результаты полногеномного секвенирования ДНК в группе пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии	131
3.6 Анализ генов липидного обмена у пациентов с коронарным атеросклерозом с использованием методов высокопроизводительного секвенирования	135
3.6.1 Полноэкзомное секвенирование ДНК пациентов с коронарным атеросклерозом	135
3.6.2 Полногеномное секвенирование РНК стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа.....	137
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	144
ВЫВОДЫ	163
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	165
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	166
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	169
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА	211
ПРИЛОЖЕНИЕ А	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно более 70% всех случаев смерти в мире составляют случаи смерти от неинфекционных заболеваний. Максимальная доля в структуре смертности от неинфекционных заболеваний представлена сердечно-сосудистыми заболеваниями – до 17,9 миллионов человек ежегодно [1]. Из них наиболее распространены атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания – ишемическая болезнь сердца и инсульт; в 2019 г. – год предшествовавший пандемии COVID-19 – на атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания приходилось около 30% всех смертей, причем более одной из 20 смертей приходилось на лиц моложе 50 лет [2]. Распространение атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний в значительной степени обусловлено основными модифицируемыми факторами риска: высоким индексом массы тела (ИМТ), высоким артериальным давлением, гиперхолестеринемией и неправильным питанием [2-6]. Современные молекулярно-генетические и биохимические технологии играют ключевую роль в решении фундаментальных проблем атерогенеза, позволяя идентифицировать гены и их продукты, участвующие в патогенезе развития атеросклеротического процесса, изучать молекулярные механизмы патологических процессов и выявлять молекулярно-биологическую гетерогенность патологических фенотипов [5, 7-9].

Эффективным способом ранней диагностики и профилактики атеросклеротических изменений является выявление генетических маркеров предрасположенности к данной патологии и изучение их особенностей в различных популяциях [10]. Необходимо изучение каждой популяции, как по характеру вариабельности генов предрасположенности к заболеваниям, вызванным нарушениями липидного обмена, так и по особенностям их фенотипического проявления. Решение этих задач является важным для населения

России, учитывая многообразие ее этнического состава и высокую распространенность сердечно-сосудистых заболеваний [1].

В настоящее время известны гены, определенные варианты которых ассоциированы с нарушениями липидного обмена. В их число входят гены, кодирующие липопротеины и их рецепторы, внутриклеточные и внеклеточные липидпереносящие белки, ферменты [5, 6]. Использование технологий высокопроизводительного секвенирования позволяет получить новую информацию о вариабельности структуры генов липидного обмена в популяционных группах и в клинических группах лиц с гиперхолестеринемией и заболеваниями атеросклеротического генеза [11, 12].

Исследования, направленные, как на изучение ряда традиционных аспектов молекулярной эпидемиологии нарушений липидного обмена у европеоидного населения Западной Сибири, так и на постановку новых задач в этой области медико-биологической науки, являются актуальными.

Степень разработанности темы диссертации

Анализ литературы свидетельствует, что в мире активно ведется изучение генетики моногенных и многофакторных заболеваний с использованием различных технологий [11, 12]. Определена генетическая основа более двух десятков моногенных дислипидемий [5, 6, 12]. При молекулярно-генетическом исследовании могут быть выявлены как редкие, так и распространенные варианты изменения структуры ДНК, лежащие в основе дислипидемии [13]. Несмотря на то, что пациентам с крайними отклонениями от референсных значений холестерина липопротеинов низкой плотности, триглицеридов или холестерина липопротеинов высокой плотности может проводиться молекулярно-генетическое тестирование, менее половины пациентов по результатам тестирования получают влияние на лечение или исходы заболевания [14, 15]. В 40-50% случаев причины фенотипически выраженной семейной гиперхолестеринемии остаются неизвестны [14]. В России изучение молекулярно-генетических особенностей семейной гиперхолестеринемии проводится в разных регионах страны на протяжении

нескольких десятилетий [7,10, 16,17]. Ограничение размера выборок пациентов с семейной гиперхолестеринемией затрудняет анализ клинического течения заболевания при различных локализациях патогенных вариантов в генах, и не позволяет оценить весь спектр вариабельности генов метаболизма липидов у населения России [10, 17].

После проведенного анализа литературных данных в настоящее исследование были включены как широко изучаемые в различных популяциях гены, ассоциированные с развитием моногенных и полигенных форм гиперхолестеринемии (*ABCA1, ABCG5, ABCG8, APOA1, APOA4, APOA5, APOB, APOC2, APOC3, APOE, CETP, LCAT, LDLR, LDLRAP1, LPA, LPL, PCSK9, SREBF1, STAP1*), так и менее изученные гены, которые ассоциированы с фенотипическими особенностями проявления гиперхолестеринемии (*ANGPTL3, CYP7A1, HMGCR, LIPA, LIPC, LIPG, LMF1, LMNA, MTP, NPC1L1, PLIN1, PNPLA5, POLD1, PPARA, PPARG, SAR1B, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SMAD6, SMAD7, SMAD9*) [5,6, 10-17]. Гены *APOB, ABCG5, ABCG8, CETP, LDLR, LPL, HMGCR, NPC1L1* и *PCSK9* также ассоциированы с развитием ишемической болезни сердца по данным полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) [13].

Тщательное фенотипирование в сочетании с метаболомными и молекулярно-генетическими исследованиями позволит определить новые мишени для липид-снижающей терапии. Потенциальные преимущества генетического тестирования для пациентов включают: верификацию диагноза, определение оптимальной стратегии лечения и профилактики. Понимание ограничений методов генетического тестирования также важно, как и интерпретация результатов генетических тестов.

Цель исследования

Анализ вариабельности генов метаболизма липидов и ассоциации с нарушениями липидного обмена в популяционной группе, у пациентов с семейной гиперхолестеринемией и у пациентов с коронарным атеросклерозом в Западной Сибири.

Задачи исследования

1. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири оценить частоту аллелей и генотипов ряда вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*.
2. В подвыборке лиц с максимально высокими значениями общего холестерина крови (>95 перцентиля) и лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина крови из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири выполнить анализ спектра вариантов гена *LDLR*.
3. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири изучить ассоциацию вариантов генов *APOE*, *CETP*, *LPL* и *SCARB1* с рядом биохимических показателей крови.
4. В подвыборке лиц с максимально высокими значениями общего холестерина крови (>95 перцентиля) и лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина крови из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири провести анализ ассоциации ряда вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* с формированием атерогенного субфракционного профиля липопротеинов низкой плотности.
5. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией идентифицировать редкие функционально значимые варианты в кодирующих областях и прилегающих сайтах сплайсинга генов, ассоциированных с развитием СГХС и нарушением липидного обмена, методами высокопроизводительного секвенирования и мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб.
6. У пациентов с коронарным атеросклерозом изучить спектр вариантов в генах, ассоциированных с развитием СГХС и нарушением липидного обмена, методом полноэкзомного секвенирования.
7. В образцах стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа определить наличие дифференциальной экспрессии генов, ассоциированных с

развитием СГХС и нарушением липидного обмена, методом полногеномного секвенирования РНК.

Научная новизна

Для вариантов генов липидного обмена, включённых в исследование, впервые изучена распространенность в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири, впервые выполнена оценка их ассоциации с липидным профилем и индексом атерогенности в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири. Варианты rs429358 и rs7412 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) кодирующей части гена *APOE* статистически значимо ассоциированы со средними уровнями ОХС ($p=0,0001$), ХС-ЛНП ($p=0,0001$), ТГ ($p=0,0001$), ИА ($p=0,0001$) в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири. Максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$, максимальное значение среднего уровня ХС-ЛНП выявлено для генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$ гена *APOE*. Выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами варианта rs708272 гена *CETP* и уровнями ХС-ЛВП ($p=0,0001$) в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири.

Впервые определена ассоциация вариантов изучаемых генов с атерогенным субфракционным липидным профилем. Выявлена ассоциация варианта rs320 гена *LPL* с минорным пиком частиц на нисходящей кривой субфракционного профиля ЛНП ($p=0,02$) в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири.

Впервые полное секвенирование кодирующей части гена *LDLR* выполнено не только для пациентов с семейной гиперхолестеринемией, но для популяционной выборки случаев гиперхолестеринемии и у лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина сыворотки в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири.

Впервые выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование и изучен спектр редких вариантов 43 генов, включая *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*,

у лиц семейной гиперхолестеринемией в Западной Сибири. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией определены ранее не описанные в литературе и базах данных варианты в гене *LDLR* (NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S и NM_000527:exon8:c.T1123G: p.Y375D).

Для пациентов с семейной гиперхолестеринемией были выявлены крупные делеции экзонов гена *LDLR* (NM_000527.4:c.(67+1_68-1)_(1586+1_1587-1)del и NM_000527.4: c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del) с использованием метода мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб.

У пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии при выполнении полногеномного секвенирования ДНК впервые определены следующие редкие варианты: гетерозиготный вариант (rs760657350), локализованный в акцепторном сайте сплайсинга гена *PLD1*: c.2430-1G>A, ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: c.2426del (p.Leu809CysfsTer2), новый миссенс-вариант c.10313C>G (p.Pro3438Arg) гена *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: c.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*.

В результате исследования получены новые знания о спектре вариантов в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *LIPA*, *STAP1*, *PNPLA5* и в генах *ABCA1*, *APOA1*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* у пациентов с коронарным атеросклерозом. Впервые определена дифференциальная экспрессия ряда генов липидного обмена (*ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC1*, *APOE*, *PCSK9*, *LDLR*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1*, *SREBF2* и *STAP1*) между образцами стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные оценки распространённости аллелей и генотипов вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири соотносятся с регистрируемыми в других популяциях мира. Данные варианты не

являются определяющими в более высокой распространенности сердечно-сосудистых заболеваний в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири по сравнению с популяционными группами Центральной и Восточной Европы.

Выявленные особенности ассоциации вариантов генов *APOE*, *CETP* и *LPL* могут быть использованы для оценки риска развития атеросклеротического процесса и служить основой для разработки программ профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у европеоидного населения Западной Сибири.

По результатам проведенного исследования зарегистрированы 3 новые медицинские технологии: «Диагностика наследственной предрасположенности к нарушениям липидного обмена на основании статуса полиморфизма гена аполипопротеина Е (*APOE*)»; диагностическая методика «АтероПанель»; «Комплексная молекулярно-генетическая диагностика атерогенных форм первичной гиперлипидемии».

Новые данные о структурной вариабельности генов метаболизма липидов и их ассоциации с нарушениями липидного обмена в популяционной группе, у пациентов с семейной гиперхолестеринемией и у пациентов с коронарным атеросклерозом в Западной Сибири дополняют знания о формировании нарушений липидного обмена у населения в разных регионах России.

Молекулярно-генетическая диагностика семейной гиперхолестеринемии с использованием авторской таргетной панели генов внедрена в практику Городского научно-практического липидного центра г. Новосибирск. Внедрение метода молекулярно-генетической диагностики как этапа каскадного скрининга семейной гиперхолестеринемии позволило повысить качество диагностики заболевания и лечения нарушений липидного обмена у молодых лиц трудоспособного возраста.

Результаты анализа дифференциальной экспрессии генов липидного обмена, вовлеченных в процесс стабилизации/дестабилизации атеросклеротической бляшки, актуальны для выявления молекулярных факторов, отражающих

процессы, связанные с дестабилизацией бляшек, особенно для пациентов с бессимптомным течением заболевания.

Зарегистрированы базы данных: «Генетические маркеры у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в регуляторных и не регуляторных областях генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*» (RU 2017620408, 07.04.2017), «Частоты распространённых полиморфизмов генов в популяции г. Новосибирска» (RU 2019620721, 07.05.2019), «Экзомы пациентов с коронарным атеросклерозом» (RU 2020622711, 21.12.2020), «База данных ансамбля деревьев для прогнозирования семейной гиперхолестеринемии на основе машинного обучения и секвенирования нового поколения» (RU 2022623708, 27.12.2022).

Результаты исследования частично включены в российские клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии (Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии / Ежов М.В., Бажан С.С., Ершова А.И., Мешков А.Н., Соколов А.А., Кухарчук В.В., Гуревич В.С., Воевода М.И., Сергиенко И.В., Шахтштейнер Е.В., Покровский С.Н., Коновалов Е.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербакова М.Ю., Захарова И.Н., Балахонова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. / Атеросклероз и дислипидемии. 2019. № 1 (34). С. 5-43).

Методология и методы диссертационного исследования

В исследование включены две клинических группы пациентов: с семейной гиперхолестеринемией и коронарным атеросклерозом (Западная Сибирь, Россия) и группа из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия).

Выборка из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия) сформирована на базе одномоментного эпидемиологического обследования взрослого населения в двух административных районах г. Новосибирска (Западная Сибирь). Для оценки частоты аллелей и генотипов, ряда вариантов генов липидного метаболизма, и изучения ассоциации вариантов генов с рядом биохимических показателей крови из основной выборки были отобраны

методом случайных чисел 936 человек, что составило 10% обследованных лиц. Для проведения молекулярно-генетического исследования оказались доступны – 909 человек – 9,7% от основной выборки (50% мужчины; возраст 45-69 лет; средний возраст $53,8 \pm 7$ лет). Исследование имеет ограничение в связи с тем, что популяционный фрагмент изучался для возраста 45-69 лет. Обследование участников исследования из популяционной выборки проводилось бригадой врачей по стандартным методикам и проходило в специально оборудованных центрах. В ассоциативных исследованиях оценку различий средних значений количественных показателей между разными генотипами проводили с помощью одномерного дисперсионного анализа. Критерием статистической значимости фактора был уровень $p \leq 0,01$.

Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией (СГХС) составила 80 пациентов (лица старше 18 лет $n=69$; 26% мужчины; возраст 20-73 лет; средний возраст $45,4 \pm 13,5$ лет; лица младше 18 лет $n=11$; 55% мужчины; возраст 7-17 лет; средний возраст $12,7 \pm 3,9$ лет), направленных врачом-липидологом на молекулярно-генетическое исследование, с диагнозом семейная гиперхолестеринемия. Диагноз СГХС был поставлен с использованием клинических липидных критериев Dutch Lipid Clinic Network Criteria.

Образцы атеросклеротических бляшек и венозной крови были получены от пациентов с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без ОКС со стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК ($n=30$; 100% мужчины; возраст 40-70 лет; средний возраст $53,0 \pm 3,8$ лет). От каждого пациента были получены по 3 образца материала эндартерэктомии, содержащего атеросклеротические бляшки. Каждый образец был поперечно и продольно разделен на 4 фрагмента, содержащие части атеросклеротических бляшек, для проведения гистологических исследований, биохимических и молекулярно-генетических исследований.

Особенность настоящего исследования заключается в генотипировании всех вышеперечисленных групп в одной лаборатории по стандартным методикам. Группы сформированы из представителей одной популяции, что исключает

межпопуляционные различия, которые затрудняют оценку функциональной значимости изучаемого варианта. На материале популяционной группы выполнены исследования частоты встречаемости ряда распространенных вариантов в генах липидного обмена и ассоциативные исследования с биохимическими показателями; в группе пациентов с диагнозом семейная гиперхолестеринемия выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование генов, ассоциированных с развитием СГХС и генов липидного обмена; в группе пациентов с коронарным атеросклерозом выполнено полноэкзомное секвенирование образцов ДНК и полногеномное секвенирование образцов РНК с анализом генов липидного обмена.

Для анализа найденных вариантов использовались существующие данные о клинической значимости аннотированных однонуклеотидных вариантов в базах данных, а также возможные функциональные и значимые эффекты вариантов оценивались с помощью инструментов прогнозирования *in silico*. Патогенность каждой новой мутации оценивалась в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии. Номенклатура выявленных вариантов приведена согласно рекомендациям Sequence Variant Nomenclature (<http://varnomen.hgvs.org/>).

Основные положения, выносимые на защиту

1. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири частота аллелей и генотипов изученных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* статистически значимо не отличается от популяций Центральной и Восточной Европы.
2. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири вариант rs429358&rs74123 гена *APOE* ассоциирован с уровнем в крови ОХС, ХС-ЛНП, ТГ и индексом атерогенности, вариант rs708272 гена *CETP* ассоциирован с уровнем в крови ХС-ЛВП.

3. В подвыборке из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири вариант rs320 гена *LPL* ассоциирован с повышением количества атерогенных мелких плотных частиц липопротеинов низкой плотности.

4. В подвыборке лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина крови из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири спектр вариантов в гене *LDLR* отличается меньшей вариабельностью в сравнении со спектром вариантов в гене *LDLR* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией (клиническая выборка) и у лиц с максимально высокими значениями общего холестерина крови (>95 перцентилья) из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири.

5. У пациентов с СГХС гетерозиготная форма заболевания в 73,1% случаев обусловлена редкими вариантами в гене *LDLR*, в 11,5% – в гене *APOB* и в 15,4% – редкими вариантами в других генах, ассоциированных с нарушениями липидного обмена (*LPL*, *SREBF2*, *APOC3*, *ABCG5*). Выявлены два новых вероятно патогенных варианта в гене *LDLR*. В подвыборке лиц из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири, дифференцированных по уровню общего холестерина крови (>95 перцентилья), выявлены редкие патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *LDLR*.

6. У пациентов с коронарным атеросклерозом определены различия в профиле экспрессии отдельных генов липидного обмена в нестабильной атеросклеротической бляшке дистрофически-некротического типа (*ABCA1*, *APOE*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1*, *STAP1*) и стабильной атеросклеротической бляшке фиброзного типа (*APOB*, *LDLR*, *LDLRAP1*, *SREBF2*).

Степень достоверности

Для изучения частоты распространенности вариантов в генах, ассоциированных с липидным обменом, в НИИТПМ – филиале ИЦиГ СО РАН была обследована выборка из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия). Для генетического анализа было доступно 9360 проб. Средний возраст обследованных лиц составил $53,8 \pm 7$ лет, в этническом отношении

более 90% обследованных составили европеоиды. Для молекулярно-генетического исследования нарушений липидного обмена из основной выборки были отобраны методом случайных чисел 936 человек, что составило 10% обследованных лиц.

Мощность выборки рассчитывалась при помощи программы «Genetic Power Calculator» для анализа размера выборки генетических ассоциативных исследований с различной частотой редких аллелей (MAF) и относительных генетических рисков (GRR). Относительные риски от 1,1 до 1,3 находятся в диапазоне, который можно ожидать в исследованиях генетических ассоциаций мультифакториальных заболеваний.

При применении программы минимальный необходимый объем выборки для проведения молекулярно-генетического анализа 396 человек, с относительным генетическим риском 1,3 для частоты редкого аллеля более 5%. Для проведения молекулярно-генетического исследования и анализа изучаемых факторов риска оказались доступны – 909 человек (9,7% от основной выборки). Исследование имеет ограничение в связи с тем, что популяционный фрагмент изучался для возраста 45-69 лет.

Согласно современным нормативам статистического анализа, объем выборки был достаточным для выполнения задач ассоциативного исследования и определялся с учетом требований к надёжности и достоверности получаемых результатов.

Степень достоверности полученных результатов проведённого исследования определяется соответствием дизайна исследования критериям доказательной медицины, большим по численности исследуемым группам, хорошим методическим уровнем выполненных исследований и качественным проведением лабораторных исследований по протоколам международных проектов. Статистические методы адекватны поставленным задачам, статистическая обработка фактического материала включала создание баз данных, автоматизированную проверку качества подготовки информации и статистический анализ с использованием пакета прикладных статистических программ SPSS Software.

Патогенность каждой новой мутации оценивалась в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии. Номенклатура выявленных вариантов приведена согласно рекомендациям Sequence Variant Nomenclature (<http://varnomen.hgvs.org> [16.10.2023]).

Первичная документация и материалы статистической обработки проверены и признаны достоверными. Результаты исследования опубликованы в реферируемых изданиях и не получили критических замечаний.

Апробация работы

Основные результаты исследования по теме диссертационной работы представлены и обсуждены на российских и международных конференциях и конгрессах: Российском национальном конгрессе кардиологов (Москва, 2008, 2010, 2011, 2015, 2018, 2023; Казань, 2014, 2022; Екатеринбург, 2016, 2019; Санкт-Петербург, 2017); Международной конференции по биоинформатике, регуляции генома и структурной/системной биологии (г. Новосибирск, 2008, 2014, 2016); Съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 г.); Конференции «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов» (Санкт-Петербург, 2009); Съезде генетиков и селекционеров (Москва, 2009); Национальном конгрессе терапевтов (Москва, 2009, 2011, 2020); VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010); Международном конгрессе «Кардиология на перекрестке наук» (Тюмень, 2010); Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы сердечно-сосудистой патологии» (Кемерово, 2010); Съезде терапевтов Сибири и Дальнего Востока (Новосибирск, 2010, 2012, 2014); Съезде кардиологов Сибирского федерального округа (Кемерово, 2011, 2015, 2019); III Евразийском конгрессе кардиологов (Москва, 2014); VIII Всероссийской Научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 2014); Симпозиуме Международного общества атеросклероза (Санкт-Петербург, 2016);

XI ежегодной научно-практической конференции Национального общества по изучению атеросклероза (Новосибирск, 2018), Всероссийском Конгрессе с международным участием «Физиология и тканевая инженерия сердца и сосудов: от клеточной биологии до протезирования» (Кемерово, 2019); Конференции «Геном человека» (2011, Дубай, ОАЭ); Конгрессе Европейского Общества Атеросклероза (г. Стамбул, Турция, 2008; г. Гамбург, Германия, 2010; г. Гетеборг, Швеция, 2011; г. Милан, Италия, 2012; г. Лион, Франция, 2013; г. Мадрид, Испания, 2014; г. Глазго, Великобритания, 2015; г. Инсбрук, Австрия, 2016; г. Прага, Чешская Республика, 2017; г. Лиссабон, Португалия, 2018; г. Маастрихт, Нидерланды, 2019; г. Женева, Швейцария, 2020; г. Хельсинки, Финляндия 2021). Втором Всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (Томск, 2021).

Апробация диссертационной работы проведена на межлабораторном семинаре Научно-исследовательского института терапии и профилактической медицины – филиал ИЦиГ СО РАН 23.04.2024 г.

Внедрение результатов работы

Материалы диссертации, ее выводы и рекомендации используются в учебном процессе при подготовке ординаторов и аспирантов в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале ИЦиГ СО РАН.

Материалы диссертации, ее выводы и рекомендации используются в практике Городского научно-практического липидного центра г. Новосибирска.

Практические рекомендации и выводы диссертационной работы используются в практической работе Государственного автономного учреждения Республики Саха (Якутия) «Республиканская клиническая больница №3» на консультативном приеме врачей-кардиологов и формируется регистр пациентов Республики Саха (Якутия) с гиперхолестеринемией для молекулярно-генетической диагностики наследственных форм заболевания.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 63 научных работы, из них 20 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Российской Федерации, и 6 статей в зарубежных рецензируемых журналах, пять из которых входят в первый квартиль (Q1) JCR международной реферативной базы данных и систем цитирования Web of Science, 4 свидетельства о государственной регистрации баз данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 232 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав (обзор, литературы, материалы и методы, результаты исследования), заключения, практических рекомендаций, выводов, библиографического указателя и Приложения А. Работа содержит 24 таблицы, 11 рисунков. Указатель литературы включает 381 источник (41 отечественный и 340 зарубежных).

Личный вклад автора

Работа представляет собой самостоятельное научное исследование, проведенное с использованием современных методов исследования, в том числе высокопроизводительного секвенирования. В диссертационной работе представлены результаты, полученные автором лично или под его непосредственным руководством. Автором проведен обзор литературы по теме диссертации. Автором составлена база данных пациентов с семейной гиперхолестеринемией (80 чел.), проведен осмотр части обследованных лиц (730 чел.), включенных в исследование из популяционной выборки европеоидного населения Западной Сибири (проект HAPIEE). Выполнена пробоподготовка образцов для молекулярно-генетического анализа с помощью полноэкзомного (30 чел.), таргетного секвенирования (80 чел.), и полногеномного секвенирования ДНК (5 чел.), выполнена ПЦР в режиме реального времени и ПЦР-ПДРФ для всех анализируемых в работе вариантов, проведена статистическая обработка, анализ и

интерпретация полученных данных. Автором разработана таргетная панель генов для изучения нарушения липидного обмена и дифференциальной диагностики гиперхолестеринемии, представленная в работе. В соавторстве были написаны и опубликованы печатные работы, в которых отражены полученные результаты. Автором представлены результаты исследований в виде докладов на российских и международных научных мероприятиях.

Результаты, представленные в диссертационной работе, получены при выполнении программы «Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические механизмы формирования липидных факторов риска заболеваний терапевтического профиля в Сибири (бюджетная тема №041, 12.12.2008), бюджетной темы государственного задания «Молекулярно-генетические механизмы развития метаболических нарушений при моногенных формах распространенных заболеваний человека» (№АААА-А19-119100990053-4, 28.12.2019 г.) и при финансовой поддержке грантов, в которых автор исследования являлся руководителем проекта: грант Российского научного фонда (№22-25-00743); грант Российского фонда фундаментальных исследований (№19-015-00458а); грант Президента РФ для молодых кандидатов наук (МК-2009); гранты 2005 и 2006 ФЦНТП; грант мэрии города Новосибирска для молодых ученых 2007 г.; трэвел гранты Европейского Общества по изучению атеросклероза 2015 и 2021 для учёных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

По данным всемирной организации здравоохранения ежегодно более 70% (41 миллион человек) всех случаев смерти в мире составляют случаи смерти от неинфекционных заболеваний. Наибольшая доля в структуре смертности от неинфекционных заболеваний представлена сердечно-сосудистыми заболеваниями (до 17,9 миллионов человек ежегодно) [1]. Из них наиболее распространены атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания – ишемическая болезнь сердца и инсульт; в 2019 г. на атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания приходилось около 30% всех смертей, причем более одной из 20 смертей приходилось на лиц моложе 50 лет [2]. Распространение атеросклеротических сердечно-сосудистых заболеваний в значительной степени обусловлено основными модифицируемыми факторами риска: высоким индексом массы тела (ИМТ), высоким артериальным давлением, высоким уровнем холестерина и неправильным питанием [2].

Современные молекулярно-генетические и биохимические технологии играют ключевую роль в решении фундаментальных проблем атерогенеза, позволяя идентифицировать гены и их продукты, участвующие в патогенезе развития атеросклеротического процесса, изучать молекулярные механизмы патологических процессов и выявлять молекулярно-биологическую гетерогенность патологических фенотипов. Эффективным способом ранней диагностики и профилактики атеросклеротических изменений может являться выявление генетических маркеров предрасположенности к данной патологии и изучение их особенностей в различных популяциях. Необходимо изучение каждой популяции, как по характеру вариабельности генов предрасположенности к заболеваниям, вызванным нарушениями липидного обмена, так и по особенностям их фенотипического проявления. Решение этих задач является важным для населения России, учитывая многообразие ее этнического состава и высокую распространенность сердечно-сосудистых заболеваний [3,4].

1.1 Нарушения обмена липидов

Дислипидемия – аномальный уровень, как повышенный, так и пониженный, холестерина (ОХС, ХС-ЛПНП, или ХС ЛПВП) и/или триглицеридов. Дислипидемия относится к часто встречающимся клиническим состояниям и является важным фактором, определяющим развитие сердечно-сосудистых заболеваний [5].

Гиперлипидемия (повышенный уровень липидов крови) может быть обусловлена накоплением липопротеинов одного или нескольких типов. Механизм накопления определяется повышенным синтезом липопротеинов, увеличением секреции в систему кровообращения, снижением удаления из кровообращения и сочетанием этих процессов.

Нарушения обмена липидов вследствие генетических дефектов, классифицируются как первичные. Дефекты могут быть как моногенные (таблица 1.1), так и полигенные [5].

Патологические состояния, например, гипотиреоз, акромегалия, сахарный диабет, обструктивные заболевания печени, заболевания почек, порфирия опосредованно приводящие к нарушению метаболизма липидов, а также прием некоторых лекарственных препаратов, классифицируются как вторичные дислипидемии [6]. В развитии гиперлипидемии часто сочетаются обе причины: первичные изменения в структуре генов и вторичные нарушения.

Алиментарная гиперлипидемия развивается в следствие избытка содержания холестерина в пище, повышенного общего потребление жиров, насыщенных жиров и избыточной калорийности диеты. Дефицит в продуктах питания нерафинированных углеводов, крахмала, волокнистых компонентов и растительного белка способствует развитию гиперлипидемии. Выделяют транзиторную (после однократного употребления жирной пищи на следующие сутки) и хроническую алиментарную гиперлипидемию. Чаще всего при хронической алиментарной гиперлипидемии отмечается повышение уровня ОХС и ТГ [7].

Таблица 1.1 – Распространенные наследственные нарушения липидного обмена, развивающиеся при наличии патогенного варианта в одном гене

Ген	Заболевание	Тип наследования	Основные изменения в плазме крови
<i>APOA1</i>	Семейная недостаточность аполипопротеина A1	Аутосомно-рецессивный	ХС-ЛВП
<i>APOB</i>	Семейная недостаточность аполипопротеина B100	Аутосомно-доминантный	ХС-ЛНП
<i>APOC2</i>	Семейная недостаточность аполипопротеина C2	Аутосомно-рецессивный	ХМ, ХС-ЛОНП
<i>APOC3</i>	Семейная недостаточность аполипопротеина C3	Аутосомно-рецессивный	ХС-ЛВП
<i>APOE</i>	Семейная гиперлипопротеинемия III типа	Аутосомно-рецессивный (редко аутосомно-доминантный)	ХС-β-ЛОНП
<i>ABCA1</i>	Болезнь Танжье (Танжерская болезнь)	Аутосомно-рецессивный	ХС-ЛВП
<i>CETP</i>	Недостаточность БПХЭ	Аутосомно-рецессивный	ХС-ЛВП
<i>LHAT</i>	Недостаточность ЛХАТ	Аутосомно-рецессивный	ХС-ЛВП
<i>LPL</i>	Семейная недостаточность ЛПЛ	Аутосомно-рецессивный	ХМ, ХС-ЛОНП
<i>LDLR</i>	Семейная гиперхолестеринемия	Аутосомно-доминантный	ХС-ЛНП

В медицинской практике широко используется классификация (таблица 1.2) гиперлипидемии по Фредриксону 1967 г. Фредриксон, Леви, Лис (ВОЗ) [8].

Таблица 1.2 – Классификация гиперлипидемии, 1967 г. Фредриксон, Леви, Лис (ВОЗ)

Тип	ОХС	ТГ	Изменения липопротеинов	Распространенность (%)	Атерогенность
I	Повышен	Повышены или норма	↑ХМ	<1	Не атерогенная
IIa	Повышен	Норма	↑ЛНП	10	Высокая
IIb	Повышен	Повышены	↑ЛНП/ЛОНП	40	Высокая
III	Повышен	Повышены	↑ЛПП	<1	Высокая
IV	Чаще норма	Повышены	↑ЛОНП	45	Умеренная
V	Повышен	Повышены	↑ХМ и ЛОНП	5	Низкая

В основе этой классификации лежит оценка концентрации липидов и липопротеинов в сыворотке крови. Данная классификация удобна для практического применения, привлекает внимание к природе метаболических нарушений и позволяет установить степень атерогенности гиперлипидемии.

В тоже время классификация имеет ряд ограничений: несоответствие фенотипов липопротеинов генетическим дефектам, определяющим эти фенотипы (один и тот же фенотип может обнаруживаться при разных заболеваниях); не содержит информации относительно этиологии нарушения – первичной или вторичной; не даёт возможности поставить диагноз заболевания [9]. Молекулярно-генетический анализ природы гиперлипидемии, в дополнение к определению концентрации липидов и липопротеинов сыворотки крови, позволяет устранить эти недостатки [10].

1.2 Молекулярно-генетические основы развития гиперлипидемии

Современные методы молекулярно-генетических исследований позволяют определить связь между аллельным вариантом в определенном регионе генома и изучаемым признаком. По данным полноэкзомного секвенирования известно более 250 локусов, ассоциированных с гиперлипидемией [11-13]. Проведенные полногеномные анализы ассоциаций с уровнем липидов крови человека подтвердили ассоциативные данные, полученные в более ранних исследованиях: 16 локусов, в том числе, локус *LDLR* были значимо ($p=10^{-23}$) ассоциированы с уровнем общего холестерина [14-17], и позволили идентифицировать новые локусы (*FADS1/2/3*, *ABCG5/8*, *TMEM57*, *MADD-FOLH1*, *CTCF-PMRT8*, *DNAH11*), контролирующие уровень липидов [18]. Эти гены кодируют не только структурные части липопротеинов, рецепторы липопротеинов и их лиганды, ферменты, транспортные белки, но и большое количество транскрипционных факторов. Более 90% вариантов в генах, ассоциированных с регуляцией метаболизма липидов, расположены вне кодирующих участков. Эти данные показывают, что может существовать значительное количество неизвестных механизмов липидного гомеостаза, нарушение которых может привести к гиперхолестеринемии [19].

Гиперхолестеринемия, как частный случай гиперлипидемии, характеризуется повышенным уровнем холестерина крови. При различных патологических состояниях повышается уровень общего холестерина и/или холестерина липопротеинов одного или нескольких типов (ХС-ЛНП, ХС-ЛОНП, ХС-ЛПП).

Варианты генов, изучаемые в работе, выбраны с учетом данных полноэкзомного секвенирования и включают как варианты, ассоциированные с полигенным наследованием гиперхолестеринемии (*ABCA1*, *APOA1*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1*, *SREBF2* и др.), так и варианты, ассоциированные с моногенным наследованием гиперхолестеринемии (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA* и др.).

1.3 Роль генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* в липидном обмене

1.3.1 Ген *ABCA1*

АТР-binding-cassette transporter A1 (*ABCA1*) – представитель семейства транспортных протеинов, обеспечивающих обмен холестерина и фосфолипидов в клетке. АВС-протеины транспортируют различные молекулы через интра- и экстрацеллюлярную мембрану. *ABCA1* интегрированный мембранный белок, обеспечивающий односторонний транспорт свободного холестерина и фосфолипидов из клеток и включение их в частицы, обедненные липидами и содержащие аполипопротеин A1 [20]. Ген *ABCA1* расположен на хромосоме 9 в локусе 9q31 [21]. По данным литературы мутации в гене *ABCA1* ассоциированы с Танжерской болезнью (редкое наследственное заболевание, характеризующееся отсутствием липопротеинов высокой плотности) и семейной формой недостаточности липопротеинов высокой плотности [22].

Гены семейства АВС участвуют в регуляции уровня холестерина плазмы. Изменчивость концентрации холестерина, который поступает с пищей регулируется X рецептором печени (LXR). LXR рецептор определяет темп всасывания холестерина в кишечнике через АТФ-зависимый кассетный транспортер семейства генов АВС [23]. Патогенные варианты в гене *ABCA1* изменяют эффлюкс холестерина. Это приводит к снижению плазменного уровня ЛВП и нарушению обратного транспорта холестерина в печень [24, 25].

Влияние белка *ABCA1* на эффлюкс холестерина и на образование ЛВП наглядно демонстрируется генетическим дефектом, возникающим при Танжерской болезни. Это редко встречающееся семейное ЛВП-дефицитное состояние, характеризующееся накоплением эфиров холестерина в различных тканях. Максимально количество холестерина, при этом, наблюдается в макрофагах. Накопление эфиров холестерина приводит к гиперплазии и окрашиванию в оранжевый цвет лимфоидного глоточного кольца, лимфаденопатии, гепатоспленомегалии, часто, к периферической нейропатии и развитию ССЗ.

Носители патогенных вариантов в гене *ABCA1* в гомозиготном варианте являются обладателями экстремально низкого уровня ХС-ЛВП и аполипопротеина А1, умеренной гипертриглицеридемии, и уровня ХС-ЛНП около 50% от нормы. Причиной развития клинических проявлений заболевания являются патогенные варианты, которые приводят к нарушению работы транспортера. Под действием транспортера *ABCA1*, происходит превращение частицы $\text{pre}\beta 1$ в дискоидную $\alpha 4$ частицу, содержащую свободный холестерин, фосфолипиды и АПОА1 [26-27]. Если транспортер *ABCA1* патологически изменен и клеточный эффлюкс холестерина снижен, как в случае Танжерской болезни, плазма содержит только частицы $\text{pre}\beta 1$, состоящие из апоА1 и фосфолипидов. Данные частицы быстро катаболизируются, приводя к отсутствию нормальной циркуляции ЛВП у носителей патогенного варианта в гене *ABCA1*. Танжерская болезнь имеет аутосомно-рецессивный тип наследования, но клиническая картина подобная Танжерской болезни может развиваться и в случае носительства патогенных вариантов компаунд-гетерозигот гена *ABCA1* (вариант семейной гипоальфахолестеринемии) [28-31].

Частота Танжерской болезни описывается от очень редкого заболевания до распространенного 1/100 [31]. Изучена когорта 120 случаев с ХС-ЛВП менее 35 мг/дл. В случае уровня ХС-ЛВП меньше либо равного 10 мг/дл гомозиготные патогенные варианты в гене *ABCA1* определялись у 50% пациентов. В случае уровня ХС-ЛВП больше 10 мг/дл, но меньше либо равного 35 мг/дл гетерозиготные патогенные варианты в гене *ABCA1* были выявлены у 13% пациентов.

В настоящее время известно четыре несвязанных пути удаления холестерина из тканей:

- *ABCA1*-опосредованный путь (однонаправленное удаление холестерина к липид-бедным апопротеинам или $\text{pre}\beta 1$ -мигрирующим ЛВП частицам);
- *ABCG1*-опосредованный путь (однонаправленное удаление холестерина к зрелым фосфолипидсодержащим ЛВП);
- *SRB1*-опосредованный путь (двунаправленное поступление и удаление холестерина к и от зрелых ЛВП частиц);

- Пассивная жидкостная диффузия (относительно не эффективный, двунаправленное удаление и поступление холестерина от и к фосфолипидсодержащим-ЛВП частицам) [32-33].

Каждый из этих путей регуляции содержания холестерина внутри клетки важен в образовании, функциональности и метаболизме ЛВП.

Обратный транспорт холестерина – процесс непрерывной рециркуляции. Большие ЛВП частицы обменивают эстерифицированный холестерин на триглицериды посредством действия CETP и эфиры холестерина возвращаются к печени в ароВ-содержащих липопротеинах, удаленных рецептором ЛНП. Альтернативно, холестерин ЛВП возвращается непосредственно в печень через взаимодействие ЛВП и SRB1 рецептора ЛВП. Когда холестерин доставлен в печень для катаболизма, обогащенные холестерином частицы ЛВП, освобождаются от липидов. Частицы уменьшаются в размере и могут еще участвовать в эффлюксе холестерина от периферийных клеток через ABCA1 и ABCG1. Эндотелиальная липаза и секреторная фосфолипаза A2 (sPLA2) действуют на α 1 частицы и форму пре β 1 ЛВП, действие CETP и панкреатической липазы приводят к формированию дискоидных α 4 ЛВП. Эти меньшие частицы, особенно пре β 1 ЛВП, могут быть непосредственно катаболизированы почками [31-33].

Посредством процесса непрерывной модернизации, ЛВП не только транспортируют липиды, но также и эффективно отделяют белки, связанные с различными субпопуляциями, и регулируют их функцию. Частицы ЛВП никогда не находятся в установившемся состоянии. И белки, и липиды ЛВП изменяются непрерывно. В результате плазменные уровни ЛВП не могут быть отражены только измерением холестерина ЛВП [34-36].

Недавние исследования протеома подчеркнули и расширили сложность метаболизма ЛВП. Около 28 различных белков связаны с формированием пяти субпопуляций: легкие ЛВП 2b (d1.063-1.087 г/мл) и 2a (d1.088-1.110 г/мл), плотные ЛВП 3a (d1.110-1.128 г/мл), 3b (d1.129-1.154 г/мл) и 3c (d1.154-1.170 г/мл) и определяют множество биологических функций ЛВП [34]. Деление ЛВП на субпопуляции может быть использовано для дифференциального диагноза

здоровых лиц и лиц с высоким риском ССЗ. Например, у пациентов с метаболическим синдромом выявлен патологический профиль частиц ЛВПЗ с повышенным содержанием триглицеридов и сниженным содержанием эстерифицированного холестерина. Данный профиль ЛВП снижает стабильность и продолжительность жизни частиц ЛВП и уменьшает их антиоксидантные свойства [34].

В гене *ABCA1* наиболее широко изученным вариантом является rs2230806 (R219K). В ряде исследований показано, что аллель К ассоциирован со снижением риска ИБС, преимущественно в азиатских популяциях и небольшой выборке европеоидов [37-38]. В других исследованиях ассоциации с развитием ИБС выявлено не было [39]. У пациентов с тяжелой дислипидемией вариант rs2230806 гена *ABCA1* ассоциирован уровнем ТГ в плазме [40]. У лиц среднего и пожилого возраста азиатской национальности с минорным аллелем rs2230806 ниже риск развития СД2 [41]. Показанная в различных исследованиях гетерогенность функциональной значимости rs2230806 требует дальнейшего анализа данного варианта в различных популяциях.

Вариант rs2066718 (V771M) гена *ABCA1* не ассоциирован с развитием фенотипа Танжерской болезни, но может играть важную роль в патофизиологических механизмах развития деменции [42], особенно, в присутствии аллеля ε4 гена *APOE* [43].

Изучение гена *ABCA1*, ассоциированного с функцией и формированием ЛВП, позволит определить ключевые факторы, которые влияют на сборку и клиренс этих частиц и развитие сердечно-сосудистой патологии [44-46].

1.3.2 Ген *APOA1*

Группа аполипопротеинов А является основными белковыми компонентами ЛВП. Ген *APOA1* человека находится на хромосоме 11q23, содержит 4 экзона и связан с кластером генов, кодирующих аполипопротеин С3, аполипопротеин А4 и аполипопротеин А5. Регуляция генов в этом кластере также взаимосвязана. Энкайсер 3' для *APOC3* оказывает влияние на экспрессию *APOA1* и *APOC3*, и оба,

энхансер *APOC2* и промотор *APOA1*, необходимы для нормальной экспрессии *APOA1* [47].

Аполипопротеин А1 (апоА1) относится к транспортным белкам и переносит в крови и межклеточной среде моноглицериды, диглицериды, эфиры холестерина, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, играя важную роль в процессе обратного транспорта холестерина. Основная функция АпоА1 в переносе жирных кислот и спирта холестерина – акцептор фосфолипидов [48, 49].

АпоА1 – основной белок в составе липопротеинов высокой плотности (ЛВП). АпоА1 содержит 243 аминокислоты, молекулярная масса 28,1 кДа. Структура ЛВП определяется последовательностью аминокислотных остатков в полипептиде апоА1 и представлена полярным монослоем и бислоем из фосфатидилхолина и аминофосфолипидов. ЛВП содержат небольшое количество белка и ассоциированных липидов. Пул частиц ЛВП является гетерогенным и состоит из нескольких субпопуляций, которые значительно различаются по плотности, размеру, форме, составу и поверхностному заряду. В зависимости от связывания в структуре ЛВП разных липидов они делятся на субфракции ЛВП-1, ЛВП-2а, ЛВП-2б и ЛВП-3. По месту синтеза и функциональным особенностям разделяют апоА1, синтезированный в энтероцитах и в гепатоцитах. Основной функцией ЛВП, синтезированных в энтероцитах, является транспорт к клеткам экзогенных эссенциальных полиеновых жирных кислот. А основной функцией ЛВП, сформированных с участием апоА1, синтезированного в печени, является транспорт холестерина от клеток к печени [50]. В ЛВП наиболее широко распространены аполипопротеины апоА1 и апоА2, которые делят ЛВП на две главных субпопуляции: LpA1, частицы, содержащие только апоА1 и LpA1:A2, частицы, содержащие оба аполипопротеина апоА1 и апоА2. Частицы LpA1:A2 меньше по размеру и более плотные, преобладают в подфракции ЛВП3. Другие аполипопротеины, содержащиеся в ЛВП – это апоЕ, апоА4 и апоС. Частицы ЛВП служат также транспортерами многих белков, таких как параоксоназа, белки острой фазы, протеазные ингибиторы и другие [50].

Частицы ЛВП непрерывно подвергаются ремоделированию, процессу, который изменяет размер, форму, поверхностный заряд или состав ЛВП. В ремоделировании участвуют ферменты лецитинхолестеролацилтрансфераза (ЛХАТ), липопротеинлипаза (ЛПЛ), печеночная липаза (ПЛ), ЭЛ, белки-переносчики эфиров холестерина и фосфолипидов, другие компоненты, например, ABCA1, ABCG1 и SRBI.

Asztalos B. et al. при исследовании лиц с генетическими дефектами и недостаточностью ключевых факторов метаболизма ЛВП была построена схема ремоделирования ЛВП [51]:

Секреция apoA1 и формирование преβ1 ЛВП

В отсутствии дефицита apoA1 и нормальной экспрессии гена *APOA1*, печень и, в меньшей степени, кишечник, секретируют apoA1 как частицу бедную липидами. Достаточно быстро apoA1 соединяется с фосфолипидами плазмы и преобразуется в преβ1 ЛВП, дискоидную частицу, содержащую две молекулы apoA1. Если apoA1 не секретируется, то apoA1 содержащие частицы в плазме отсутствуют; отмечается дефицит ЛВП и серьезные ССЗ с началом в молодом возрасте.

От преβ1 к α4 через ABCA1-опосредованный эффлюкс холестерина

Если и *APOA1*, и *ABCA1* экспрессируются и функциональны, однонаправленный эффлюкс холестерина и фосфолипидов от клетки до частиц преβ1, под действием ABCA1, превращает частицу преβ1 в дискоидную α4 частицу, содержащую свободный холестерин, фосфолипиды и apoA1. Если транспортер ABCA1 патологически изменен и клеточный эффлюкс холестерина снижен, как в случае Танжерской болезни, плазма содержит только частицы преβ1.

От α4 к α3 с помощью ЛХАТ

ЛХАТ активирует эстерификацию свободного холестерина в α4 частицах, в результате формируются большие, α3 ЛВП. α3 частицы содержат apoA2, следовательно, α3 частицы могут быть классифицированы как частицы LpA1:A2I. Без ЛХАТ плазма содержит только преβ1 ЛВП, много α4 ЛВП и большие липид не содержащие частицы, сформированные скоплением дискоидных apoA1 частиц.

От $\alpha 3$ к $\alpha 2$ и $\alpha 1$ с помощью ЛПЛ

ЛПЛ гидролизует липиды в ароВ-содержащих липопротеинах и, таким образом, превращает хиломикроны и липопротеины очень низкой плотности (ЛОНП) в ремнантные липопротеины. Это также вызывает выход аполипопротеинов, фосфолипидов и свободного холестерина для включения в ЛВП, увеличивая размер частицы и формируя $\alpha 1$ ЛВП, большую сферическую частицу LpA1. У пациентов с дефицитом ЛПЛ в плазме есть некоторое количество пре $\beta 1$, пре α и $\alpha 1$ частиц, содержащих ароA1.

От $\alpha 1$ в $\alpha 2$ с помощью ПЛ

Ферментативное действие ЛХАТ и ЛПЛ приводит к увеличению размеров частиц ЛВП, компенсируемое активацией печеночной липаз. ПЛ преобразовывает большие $\alpha 1$ частицы назад в $\alpha 2$ и даже дискоидные $\alpha 4$ ЛВП. Без ПЛ это преобразование невозможно. Вместе, эти три фермента катализируют появление четырех различных частиц: $\alpha 4$, маленьких дискоидных LpA1 частиц; $\alpha 3$, относительно маленьких сферических частиц LpA1:A2; $\alpha 2$, больших сферических частиц LpA1:A2; и $\alpha 1$, очень больших сферических частиц LpA1 [51].

Биогенез ЛВП – последовательное взаимодействие апоA1 с липидами и другими белками до зрелой формы, сферических частиц, – регулируется несколькими ключевыми метаболическими процессами, в которых участвуют ABCA1 транспортер, ABCG1 транспортер, ферменты ЛХАТ, липопротеинлипаза (ЛПЛ), белок, переносящий эфиры холестерина, скэвенжер-рецептор класса В, тип 1. Степень активности этих процессов и структура регулирующих компонентов зависят от кодирующих данные компоненты генов [52].

Нарушения первичной структуры апоA1, приводящие к дислипидотеинемии, обусловлены различными патогенными вариантами в гене *APOA1*.

Делеции в *APOA1/APOC3/APOA4* генном кластере ассоциированы с тяжелым ЛВП дефицитом и высоким коронарным риском. Пациенты, у которых диагностирована делеция всего генного кластера, имеют уровень ХС-ЛВП в плазме ниже 10 мг/дл, нарушение абсорбции жиров и раннее начало ССЗ. Делеция только

APOA1 и *APOC3* также приводит к значительному снижению уровня ХС-ЛВП, но без аномалий в абсорбции жира. Пациенты с делецией только *APOA1* имеют нормальный уровень триглицеридов и относительно нормальную величину апоЕ и апоА4-содержащих частиц, но плазменный уровень ХС-ЛВП у этих пациентов ниже 5 мг/дл и пациенты имеют высокий риск развития ИБС. Эти данные показывают, что экспрессия *APOA1* необходима для нормальной функции ЛВП частиц, но не является необходимой для эффлюкса холестерина из клетки [53, 54].

Низкий уровень концентрации ХС-ЛВП может также быть объяснен полиморфизмом гена *APOA1*, но в отличие от полного апоА1 дефицита, который явно ассоциирован с предрасположенностью к коронарным заболеваниям, явное снижение уровня ХС-ЛВП, причиной которого являются точечные мутации гена *APOA1*, необязательно является необходимым ключом к увеличению коронарного риска [39, 40].

Первая мутация в гене *APOA1* была описана 1980 году. У носителей *APOA1* Milano определяются очень низкие уровни холестерина ЛВП, но они не связаны с увеличением риска болезней сердца [53, 54]. Рекомбинантный ген *APOA1* Milano, помещенный в липосомы, может уменьшить атеромы в моделях животных на 30 % [55]. У носителей *APOA1* Milano (R173C) определяются очень низкие уровни холестерина ЛВП при нормальном уровне ХС-ЛНП, и низком риске развития болезней сердца [56]. *APOA1* Milano ЛВП частицы более эффективны в реализации клеточного эффлюкса холестерина через оба, ABCA1 и SR-B1, пути. Рекомбинантный ген *APOA1* Milano, помещенный в липосомы, может уменьшить атероматоз аорты в моделях животных на 30 % [56]. Носительство другой миссенс мутации в гене *APOA1*, такой как L178P, приводит к гипоальфалипотеинемии с развитием уплотнения стенки коронарных артерий и артериальной дисфункции [53].

В гене *APOA1* человека широко изучается полиморфный вариант в промоторе -75G>A, который влияет на экспрессию апоА1. Во Фрамингском исследовании в многофакторной линейной регрессионной модели концентрации холестерина ЛВП у женщин были ассоциированы со значительным

взаимодействием между потреблением полиненасыщенных жирных кислот как непрерывной переменной и генотипом *APOA1* ($P=0.005$). У мужчин подобная ассоциация не выявлена [57].

Ассоциация полиморфизма $-75G>A$ (rs670) гена *APOA1* с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) остается неясной. Выявлена ассоциация данного полиморфизма с уровнем Lp(a), концентрация которого была значительно выше ($p=0.02$) у носителей аллеля A по сравнению с носителями аллеля G гена *APOA1* независимо от пола и диабетического статуса, что может являться потенциальным риском для развития ССЗ [58]. В исследовании Chen E.S. (2009) у пациентов с сахарным диабетом 2 типа выявлена ассоциация полиморфизма гена *APOA1* со средними уровнями триглицеридов, общего холестерина сыворотки, холестерина липопротеинов низкой плотности, холестерина липопротеинов высокой плотности, креатинина, мочевины, гликозилированного гемоглобина и уровнем глюкозы крови натощак [59]. Гендерно-зависимое влияние на уровень глюкозы в сыворотке, инсулин, вес и окружность талии rs670 гена *APOA1* было показано в исследовании de Luis D.A. et al. 2019 [60]. У мужчин носителей аллеля G наблюдались высокие показатели абдоминального ожирения, низкого уровня ЛВП, гипергликемии и сахарного диабета.

Многие факторы влияют на компоненты частиц ЛВП, что приводит к их функциональным различиям. На аполипопротеин A1 влияют факторы, связанные с процессами воспаления, гликирования, этерификации липидов, изменения содержания фосфолипидов [61, 62].

1.3.3 Ген *APOB*

Ген *APOB* расположен на хромосоме 2p24.1, содержит 29 экзонов [63]. Аполипопротеин В является основным аполипопротеином хиломикронов (ХМ), ЛОНП и их ремнантов. Аполипопротеин В служит лигандом для рецептора ЛНП, обеспечивает связывание и перенос триглицеридов и эфиров холестерина [64]. Аполипопротеин В100 (синтезируется в печени) и аполипопротеин В48 (синтезируется в кишечнике) – две молекулы семейства апоВ, функционирующие

у человека, кодируются одним геном, различия обусловлены дифференциальным сплайсингом [65]. АпоВ-48 формирует хиломикроны и переносит неполярные ТГ. АпоВ-100 входит в состав ЛОНП и ЛПП, перенося насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, триглицериды, эфиры холестерина. АпоВ-100 отличается наличием нескольких доменов с разными функциями и в том числе доменом для связывания с рецептором ЛНП.

Концентрация апоВ в крови является маркером развития атеросклероза [64, 66, 67]. Известен ряд функционально значимых мутаций в гене *APOB*, приводящих к развитию гиперхолестеринемии, например полиморфизм 7673С/Т ассоциирован с повышением общего холестерина сыворотки и уровня аполипопротеина В как у мужчин, так и у женщин в популяции [65]. По данным полногеномного анализа ассоциаций выявлены новые маркеры, ассоциированные с уровнем апоВ, например, вариант С711Т гена *APOB* ($p=4 \cdot 10^{-114}$) [68].

Семейная гипобеталипопротеинемия – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся крайне низкими уровнями аполипопротеина В и ХС-ЛНП [69, 70]. В результате мутаций на участке гена *APOB*, кодирующего сайт связывания с рецептором ЛНП, могут развиваться семейные формы гиперхолестеринемии подобные развивающимся вследствие мутаций в гене *LDLR* [71]. Один из патогенных вариантов данного участка Arg3500Gln приводит к развитию гиперхолестеринемии со сниженным клиренсом ЛНП вследствие дефекта структуры ЛНП, обеспечивающей сродство с рецептором ЛНП [72]. Другой вариант – Arg3531Cys также приводит к развитию ГХС и ИБС. Мутации этого участка, чаще всего, являются спорадическими, и частота их не превышает 0,1% от всех случаев гиперхолестеринемии [73].

При анализе вариабельности участка гена *APOB*, кодирующего сайт связывания с рецептором ЛНП, в различных этнических группах населения Сибири для поиска новых функционально значимых аллельных вариантов [74]. В результате у одного из обследованных эскимосов был обнаружен гетерозиготный генотип, обусловленный однонуклеотидной заменой. С помощью прямого секвенирования амплифицированных фрагментов ДНК было обнаружено, что

полиморфизм обусловлен заменой С на G в первой позиции кодона 3405, приводящей к замене аминокислоты Gln на Glu в структуре белка (rs1042023). Аминокислота в этой позиции непосредственно участвует во взаимодействии apoB в составе ЛНП с рецептором ЛНП. Далее была изучена распространенность аллельных вариантов и генотипов в ряде этнических групп Северной и Центральной Азии, а также Северной Америки. Аллель 3405Glu выявлен с низкой частотой в выборке русских и с высокой частотой – у коренных жителей Севера [74]. Два других патогенных варианта *APOB*: p.Arg1164Thr и p.Gln4494del показали нарушение способности связывания с рецептором ЛНП и снижение поглощения ЛНП [75]. Исследования патогенных вариантов гена *APOB* необходимы для понимания их роли в развитии семейной гиперхолестеринемии ее клинических особенностей [76-77].

1.3.4 Ген *APOC3*

Кластер *APOC1*, *APOC3*, *APOC4* находится на хромосоме 11 [78]. Аполипопротеин С3 (apoC3) секретируется в печени и, в небольшом количестве, в кишечнике. Синтез apoC3 снижается за счет действия агонистов PPAR α в гепатоцитах. Аполипопротеин С3 ингибирует липопротеин липазу и печеночную липазу. ApoC3 является компонентом липопротеинов очень низкой плотности и apoB-содержащих липопротеинов, влияет на катаболизм apoB-содержащих липопротеинов и частиц ЛОНП, повышает адгезию моноцитов к эндотелиальным клеткам сосудов и активирует процесс воспаления [79]. Повышение уровня apoC3 может быть причиной развития гипертриглицеридемии [80].

Ген *APOC3* расположен на хромосоме 11q23.3, содержит промотор и дистальный регуляторный регион, который действует как энхансер для трех генов кластера аполипопротеинов 11q23 (*APOC1*, *APOC3*, *APOC4*) и 4 экзона [78, 81].

Ряд вариантов гена *APOC3* ассоциированы с нарушениями липидного обмена [82, 83]. Наблюдалась ассоциация полиморфизма T-455C с риском ИБС (ТС + СС против ТТ, OR = 1,22, 95% доверительный интервал от 1,06 до 1,42) и риском инфаркта миокарда (OR = 1,21, 95% доверительный интервал от 1,00 до 1,46) [84].

Для rs4225 показано, что аллель Т подавляет трансляцию *APOC3*, облегчая связывание miR-4271. Пациенты, носители генотипа GG, имели более высокие уровни ApoC3 в плазме (p для тенденции = 0,03), чем субъекты с генотипом TT. Кроме того, аллель Т был значительно связан со снижением уровней триглицеридов ($P = 0,03$). Исследование случай-контроль показало, что генотип TT rs4225 привел к значительному снижению общего риска ИБС (OR 0,89 (95% доверительный интервал 0,77–0,98), $P = 0,009$). Таким образом, rs4225 в 3'-UTR *APOC3* может вносить вклад в риск развития ИБС, препятствуя связыванию miR-4271 [85].

Полиморфизм Sst1 (C3238G – замена нуклеотида цитозин на гуанин в некодирующей области гена) гена *APOC3* впервые был выявлен в 1985 г. у лиц с гипертриглицеридемией [86]. Дальнейшие исследования показали высокую распространенность Sst1 полиморфизма у пациентов с различными вариантами фенотипов гиперлипидемии [87]. У носителей аллеля S2 показано повышение синтеза apoC3, что усиливает ингибирование липопротеинлипазы, тормозит катаболизм триглицеридов, а также усиливает катаболизм ЛВП. У пациентов носителей аллеля S2 отмечается гипертриглицеридемия и пониженный уровень ЛВП крови, что увеличивает риск развития атеросклеротического повреждения сосудов ($p < 0,001$) [88]. У носителей аллеля S2 также возрастает риск развития сахарного диабета и метаболического синдрома, особенно на фоне питания с большим количеством насыщенных жиров [89-92].

1.3.5 Ген *APOE*

Ген, кодирующий белок аполипопротеина Е, расположен на 19 хромосоме в кластере с генами аполипопротеина С1 и С2. Его размер составляет 3.700 пар нуклеотидов. Белок, кодируемый этим геном, является основным аполипопротеином хиломикронов. Он связывается со специфическим рецептором печени и периферических клеток и необходим для нормального катаболизма компонентов липопротеинов, богатых триглицеридами [93].

Аполипопротеин Е (апоЕ) обеспечивает поглощение холестерина через специфические рецепторы печени, способствует поглощению ремнантов хломикронов и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП) печенью, активирует липопротеинлипазу (ЛПЛ) и лицетинхолинацилтрансферазу (ЛХАТ), участвует в формировании богатых эфирами холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛНП) и перераспределении липидов в тканях [94]. Влияет на репарацию нервной системы [95]. АпоЕ относится к многофункциональным регуляторным белкам [96].

Структура апоЕ характеризуется высокой степенью упорядоченности, обусловленной наличием 65-70% α -спиральной формы [97]. В структуре апоЕ выделяются идентичные повторы по 22 аминокислотных остатка. Эти области, в том числе участок, включающий 129-158 аминокислоты, играют роль липидсвязывающих доменов. Кроме этого, Weisgraber с соавт. [98] выявили домен рецепторного связывания апоЕ, охватывающий центральный участок молекулы. Позднее с помощью синтетических фрагментов апоЕ удалось показать, что домен рецепторного связывания с рецептором занимает участок 141-155. Замещение лизина в положении 143 аланином, лейцина в положении 144 пролином или аргинина в положении 150 аланином влияет на активность рецептор связывающего домена, подтверждая тот факт, что в него вовлечен центральный участок молекулы. Высокое сродство апоЕ к рецепторам обусловлено ионным взаимодействием между кислыми и основными аминокислотными остатками области рецепторсвязывающего домена [99]. При анализе мРНК выяснена последовательность сигнального пептида. Он включает в себя 18 аминокислотных остатков. Этот сигнальный пептид затем котрансляционно удаляется [100]. Большая часть (до 80-85%) циркулирующего в плазме человека апоЕ находится в виде асиалоформы, меньшая - в виде моно- и дисиалоформ. Показано, что апоЕ, секретируемый гепатоцитами и макрофагами, как и апоЕ спинномозговой жидкости, более высоко сиалирован (связан с сиаловой кислотой), чем плазменный пул апоЕ в целом [101]. Различие секретируемого и плазменного пула апоЕ позволяет предположить, что гликозилирование апоЕ играет важную роль в

клеточном процессинге и механизме секреции этого белка. Установлено, что единственной аминокислотой, к которой присоединяется COOH-группа в процессе гликозилирования, является треонин-194. В процессинге секретированного апоЕ, по-видимому, участвуют специфические гликозидазы. При разделении вновь синтезированного апоЕ методом ультрацентрифугирования установлено, что около 50% апоЕ секретируется в "свободной" или обедненной липидами форме. Таким образом, выявлена гетерогенность, обусловленная посттрансляционной модификацией этого белка путем внутриклеточного гликозилирования и последующего десалирования в плазме крови [100-102].

Содержание апоЕ в плазме крови здорового человека составляет 3-6 мг/дл, при снижении уровня апоЕ в плазме крови повышается риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [103].

При определении других функций апоЕ выявлено, что в ткани мозга человека содержится достаточно много мРНК апоЕ (30% по отношению к печени). Астроциты способны метаболизировать липопротеины, содержащие апоЕ в качестве лиганда. На поверхности этих клеток зафиксированы высокоспецифичные рецепторы. Поскольку крупные плазматические белки не способны проникать через гематоэнцефалический барьер, в мозге существует собственная автономная система транспорта липидов, связанная с апоЕ и поддерживающая холестериновый гомеостаз в клетках нервной системы. Обращает внимание присутствие апоЕ в спинномозговой жидкости. Так, содержание апоЕ в спинномозговой жидкости человека составляет 2,7% от количества его в плазме крови, при этом, альбумина и апоА-1 - лишь 0,4 и 0,5% [104]. Обнаружены различия влияния двух изоформ $\epsilon 3$ и $\epsilon 4$ на рост дендритов и развитие цитоскелета в культуре нейрональных клеток. Полученные данные дают возможность более глубокого понимания механизмов патогенеза болезни Альцгеймера и развития других нейродегенеративных заболеваний. Кроме этого, при повреждении центральных и периферических нервов, выявлен белок аполипопротеин Е. Данный факт может быть связан с повреждением нервной ткани и активацией макрофагов. Повышение концентрации апоЕ в плазме крови, а также

комплексов апо Е с амилоидным белком наблюдалось у людей при болезни Альцгеймера [96, 105, 106].

Гетерогенность аполипопротеина Е обусловлена патогенными вариантами в гене *APOE*. Ряд вариантов в этом гене приводит к развитию семейной дисбеталипопротеинемии или гиперлипопротеинемии III типа, при которой повышенный уровень холестерина и триглицеридов в плазме является следствием нарушения клиренса хиломикронов и остатков ЛПОНП. Генотипы, содержащие $\epsilon 2$ аллель, ассоциированы с более низкими уровнями общего холестерина сыворотки (ОХС) и холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС-ЛНП), и более высоким уровнем триглицеридов (ТГ), чем генотип $\epsilon 3/\epsilon 3$. В то время как генотипы, содержащие $\epsilon 4$ аллель, имеют повышенный уровень ОХС и ХС-ЛНП [107]. В некоторых исследованиях отмечено влияние полиморфизма гена *APOE* на более высокий риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [108]. Полиморфизм в области промотора гена *APOE* (-491 А/Т) участвует в развитии нейродегенеративных заболеваний и инфаркта миокарда [109]. В популяциях Франции, Ирландии, Швеции и России частота аллелей полиморфизма промотора гена *APOE* -491А/Т составляет в среднем аллель А – 0,82; аллель Т – 0,18. В популяции США и Норвегии частота редкого аллеля Т уменьшается и составляет около 0,15-0,16. Наиболее часто аллель Т встречается в популяции Испании – 0,25 [110]. Амилоидогенный эффект аллеля $\epsilon 4$ усиливался в присутствии аллеля А полиморфизма промотора *APOE* [111, 112].

Широко изучаемый полиморфизм кодирующей части гена *APOE* 3937С/Т и 4075С/Т был впервые описан Utermann G. и соавторами [113]. Вариантами, которые приводят к появлению функционально значимых изоформ *APOE*, являются rs429358, p. Cys130Arg ($\epsilon 4$) и rs7412, p.Arg176Cys ($\epsilon 2$). Эта замена определяет изменение в структуре аминокислотной последовательности белка и приводит к синтезу белка с аминокислотами цистеин или аргинин в положении 112 и 158. При этом формируются наиболее распространенные аллельные варианты: $\epsilon 2$ (Cys112, Cys158); $\epsilon 3$ (Cys112, Arg158) и $\epsilon 4$ (Arg112, Arg158) и формируемые ими генотипы: три гомозиготных ($\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$) и три гетерозиготных ($\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$,

$\epsilon 2/\epsilon 3$). Благодаря существованию трех различных аллелей в соответствующем локусе, белок апоЕ представлен несколькими изоформами. Согласно частоте аллелей, приведенной в Genome Aggregation Database (GnomAd), с секвенированием около 100000 субъектов из различных генетических исследований, посвященных конкретным заболеваниям и популяциям, частота аллеля rs429358 составляет 14,25%, а частота аллеля rs7412 составляет 6,542% в общей популяции GnomAd. Таким образом, приблизительные показатели распространенности для $\epsilon 2/\epsilon 2$, $\epsilon 2/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 3/\epsilon 4$ и $\epsilon 4/\epsilon 4$ составляют 0,4, 6,5, 0,9, 75,9, 14,3 и 2,0% соответственно [107].

Генетический полиморфизм *APOE* является важной предпосылкой для возникновения гиперлиппротеинемии и развития атеросклероза – аллель $\epsilon 4$ является фактором риска развития атеросклероза с повышенным содержанием липопротеинов низкой плотности в крови [114].

Определено, что свыше 90% пациентов с семейной дисбеталипопротеинемией были гомозиготными по аллелю $\epsilon 2$, но в общей популяции большинство гомозигот $\epsilon 2/\epsilon 2$ были связаны с нормолипидемией. По-видимому, это обусловлено мультифакториальной основой этого заболевания и влиянием, в том числе гипергликемии, гиперинсулинемии и ожирения [116-118].

По результатам крупных мировых исследований с использованием данных UK Biobank генотипы $\epsilon 3/\epsilon 4$ и $\epsilon 4/\epsilon 4$ ассоциированы с гиперхолестеринемией и ИБС по сравнению с генотипами $\epsilon 3/\epsilon 3$, в то время как для $\epsilon 2/\epsilon 3$ показан протективный эффект для этих патологий [108]. В исследовании Rassmussen K.L. et al. носительство аллеля $\epsilon 2$ в гетерозиготном варианте было ассоциировано с умеренным снижением уровня ОХС крови и с повышенными уровнями ремнантного холестерина [119]. Для гомозигот $\epsilon 2/\epsilon 2$, при наличии других ФР, показано развитие гиперлипидемии типа III (семейная дисбеталипопротеинемия) [107]. Также по данным литературы гомозиготы по аллелю $\epsilon 2$ ассоциированы с пониженными уровнями ХС-ЛНП и повышенными уровнями ТГ в сравнении с другими генотипами [120].

1.3.6 Ген *CETP*

Ген *CETP*, кодирующий белок, переносящий эфиры холестерина (БПЭХ), расположен на хромосоме 16q21 [121].

БПЭХ – осуществляет прямой обмен эстерифицированного холестерина в двух направлениях: передает холестерин от частиц ЛВП к апоВ-содержащим липопротеинам (ЛНП и ЛОНП) и триглицеридам (ТГ), и от апоВ-содержащих липопротеинов к ЛВП. Посредством этой передачи, очень большие, АпоА1 содержащие частицы ЛВП, размером с ЛНП, преобразуются назад в α 1 обогащенные частицы. В плазме пациентов с дефицитом БПЭХ, присутствуют очень большие, неправильной формы частицы ЛВП, содержащие АпоА1, апоА2, и апоЕ. Изменение активности и концентрации данного белка приводит к нарушению процесса обратного транспорта холестерина и к развитию атеросклероза [122].

По данным литературы некоторые варианты гена *CETP* приводят к изменению функции белка. По данным полногеномного анализ ассоциаций вариации в локусе *CETP* объясняют, приблизительно, 2% дисперсии уровня холестерина липопротеидов высокой плотности с $p\text{-value} = 10^{-93}$ [123].

В гене *CETP* описан ряд вариантов, например, rs5883, rs247616, rs247617, rs1532624, rs1800775, rs3764261, rs9989419, приводящих к изменению его функции [124-126].

Наиболее широко изученный вариант TaqI B (rs708272) образован заменой в позиции +279 G/A первого интрона гена *CETP*, приводящей к появлению аллелей В1 и В2. Аллель В1 ассоциирован с изменениями в размере белка БПЭХ, его функцией и уровнем ХС-ЛВП. Полиморфизм В2 связан с низкой массой БПЭХ, повышением ХС-ЛВП и, по результатам некоторых исследований, ассоциирован со сниженным риском развития ИБС [127-129], другие исследования показывают гендер-специфичный характер ассоциации TaqI B варианта, а также зависимость от других факторов: употребления алкоголя, ИМТ и уровня инсулина [57]. Эти эффекты могут быть обусловлены и другими вариантами, наследуемыми сцепленно с TaqI B [130].

1.3.7 Ген *CLPS*

Ген *CLPS* расположен на хромосоме 6p21.31 и содержит 4 экзона. Белок колипазы, кодируемый геном *CLPS*, является кофактором, необходимым панкреатической липазе для эффективного гидролиза липидов, поступающих с пищей. Белок колипазы связывается с С-концевым некаталитическим доменом липазы. Колипаза противодействует дестабилизирующему влиянию солей кишечных желчных кислот, позволяя липазе прикрепляться к поверхности липидных мицелл. Колипаза экспрессируется только в ацинарных клетках поджелудочной железы [131].

Полиморфизм аргинин-цистеин в позиции 92 колипазы (Arg92Cys) ассоциирован с повышенным риском развития диабета 2 типа. Цистеин в позиции 92 колипазы повышает неправильное свертывание колипазы, изменяя ее внутриклеточный транспорт и функцию. У носителей варианта Arg92Cys наблюдается выделение менее функциональной колипазы в двенадцатиперстную кишку и менее эффективное переваривание липидов пищи [132].

1.3.8 Ген *LDLR*

Ген рецептора ЛНП находится на 19 хромосоме (19p13). Размер гена – 45 тысяч пар нуклеотидов, ген состоит из 18 экзонов. Экзоны 2-6 кодируют лиганд-связывающий домен, экзоны 9-13 - участок гомологичный предшественнику фактора роста эпидермиса, экзон 15 кодирует участок рецептора, содержащий О-связанные сахара, экзон 16 – трансмембранный домен и 17-18 экзоны – цитоплазматический домен [133].

Рецептор липопротеинов низкой плотности относится к семейству гомологичных по структуре клеточных поверхностных рецепторов, которые свернуты в эндоплазматическом ретикулуме и функционируют как эндоциты и сигнальные рецепторы во множестве клеточных процессов [134]. Мутации в гене рецептора липопротеинов низкой плотности у большинства пациентов ведут к изменению функции белка через формирование нарушений конфигурации рецептора.

Спектр вариантов гена *LDLR*, характеризуется выраженной гетерогенностью, например, в базе данных Human Gene Mutation Database (HGMD) [135] описано более 1800 вариантов в гене *LDLR*. Исследования по определению спектра вариантов в различных регионах продолжаются и регулярно выявляются новые варианты в данном гене. Одно из характерных для последнего десятилетия исследование гена *LDLR* на большой группе пациентов проведено в Италии [136]. Секвенирование выполнено у 1018 индексных пациентов с клиническим диагнозом гетерозиготной семейной гиперхолестеринемии (геСГХС) и у 52 пациентов с клиническим диагнозом гомозиготной семейной гиперхолестеринемии (гоСГХС). Анализ также проводился у 1008 членов семей пациентов с выявленными патогенными вариантами. Патогенные варианты обнаружили у 832 пациентов. 97,4% из определенных патогенных вариантов находились в гене *LDLR* [136]. Преобладание патогенных вариантов в гене *LDLR* в качестве причины развития СГХС характерно для многих популяций: Испании 96,4% [137], Франции 91,2% [138], Нидерландов 88% [139]. Анализ патогенных вариантов *LDLR* у пациентов с гоСГХС показал, что из 52 пациентов 51 пациент являлся носителем патогенных вариантов *LDLR*. В большинстве случаев семьи, имеющие одни и те же патогенные варианты жили в одном географическом районе Италии или переехали из такового. В исследовании подчеркивается, что даже в стране с гетерогенным генетическим фоном СГХС, такой как Италия, присутствуют скопления патогенных вариантов в конкретных географических районах, предполагая «эффект основателя» [136].

В России исследование спектра патогенных вариантов гена *LDLR* проводятся с 90-х годов 20 века [140-141]. Охарактеризовано несколько десятков патогенных вариантов в гене *LDLR* и только единичные из них являются общими для трех регионов России (Санкт-Петербурга, Москвы, Новосибирска) [142-147]. В результате исследований выявлено отсутствие мажорных патогенных вариантов в гене *LDLR* в России, что подтверждает необходимость изучения спектра патогенных вариантов в различных регионах страны на популяционном уровне. Например, варианты FH–Helsinki и FH–North Karelia, отвечающие за 60% случаев СГ в Финляндии, на территории России (Санкт-Петербург, Петрозаводск),

практически, не встречаются [148]. Ограничение размера выборок не позволяет оценить особенности клинического течения заболевания и ответ на медикаментозное воздействие при различных локализациях патогенных вариантов в гене *LDLR* у населения России. Функциональное влияние патогенных вариантов *LDLR* играет важную роль в определении фенотипа СГХС, в том числе в отношении возраста развития атеросклероза сонных артерий и преждевременной ИБС [149-151], тип патогенных вариантов *LDLR* влияет также на липидный профиль и ответ на липидснижающую терапию у пациентов с гетерозиготной СГХС [152].

1.3.9 Ген *LPL*

Липопротеинлипаза является одним из важных участников процесса удаления триглицеридов из плазмы. ЛПЛ катализирует гидролиз триглицеридов в частицах липопротеинов очень низкой плотности и хиломикронах, в активации ЛПЛ участвует аполипопротеин С2. Ген *LPL* расположен на коротком плече хромосомы 8p22 [153].

Дефицит ЛПЛ серьезное заболевание, возникающее при наличии патогенных вариантов в гене *LPL* и сопровождающееся снижением активности ЛПЛ или ее полным отсутствием [154]. Семейный дефицит ЛПЛ – аутосомно-рецессивное заболевание, характеризующееся хиломикронемией, резко выраженной гипертриглицеридемией, спленомегалией и манифестирующее, чаще всего, клиническими проявлениями острого панкреатита [155]. Пациентам рекомендуют строгую диету, с ограничением жиров менее 20 г/день, которая уменьшает проявление клинической симптоматики, однако, не снижает риск развития панкреатита. Учитывая прогрессирующую природу заболевания, важно проводить раннюю диагностику и коррекцию дефицита ЛПЛ у пациентов.

Легкие нарушения липидного обмена, не связанные с семейным дефицитом ЛПЛ выявляются при наличии ряда полиморфных вариантов в гене *LPL*. Например, вариант Asn291Ser, не имеющий изолированного влияния на концентрацию липидов плазмы или на риск ишемической болезни, в присутствии у пациента

аллеля $\epsilon 2$ полиморфизма гена *APOE*, сахарного диабета или недостаточности печеночной липазы может приводить к развитию атерогенной формы гиперлипидемии [156].

Полиморфизм rs328, S447X гена *LPL* характеризуется образованием стоп-кодона и потере 37 С-концевых аминокислот. Он связан с повышением каталитической активности ЛПЛ, что обуславливает 8% снижение среднего уровня триглицеридов в плазме [157]. Полиморфизм S447X также ассоциирован с изменениями уровня общего холестерина сыворотки. При изучении постпрандиального метаболизма липидов была выявлена ассоциация X447 аллеля с низким липемическим ответом после приема пищи и меньшим риском развития ишемической болезни сердца, в сравнении с гомозиготами S447S не зависимо от базового уровня триглицеридов [158].

Вариант rs320 (HindIII H⁺ > H⁻) гена *LPL* ассоциирован с развитием диабетической дислипидемии у пациентов с сахарным диабетом 2 типа [159]. Была изучена ассоциация rs320 с признаками ожирения в двух независимых популяциях ARIC (n = 1334). Более высокое потребление полиненасыщенных жирных кислот, поступающих, с пищей было связано с более низким ИМТ и окружностью талии у гомозигот по основному аллелю (TT) (P = 0,01 и 0,005), но не у носителей минорных аллелей (TG и GG). Rs320 рассматривается как вариант, ассоциированный с изменениями уровней липидов плазмы и риском развития атеросклероза в некоторых этнических группах [160-162].

1.3.10 Ген *SCARB1*

Генетические детерминанты метаболизма ЛВП до настоящего времени полностью не определены. Известно одиннадцать генов – ключевых для синтеза, созревания и катаболизма ЛВП: *APOA1*, *LCAT*, *ABCA1*, *CETP*, *HL*, *SCARB1*, *ABCG1*, *ATP5B*, *PLTP*, *LIPG*, *APOM*.

Ген *SCARB1* расположен на хромосоме 12q24. Белок, кодируемый этим геном, *SCARB1* является одним из нескольких рецепторов на поверхности клеток, участвующих в регуляции метаболизма липопротеинов и плазменных уровней

холестерина. SCARB1 участвуют в транспорте эфиров холестерина в клетку, стимулируют двунаправленный поток неэстерифицированного холестерина между клетками и внеклеточными липопротеинами [163]. Рецептор SCARB1 регулирует выход ХС из клеток за счет увеличения в клеточной мембране пула свободного ХС [164, 165].

Вариантов гена *SCARB1* ассоциированы с различными патологическими состояниями. Rs10846744 ассоциирован с риском развития атеросклероза и сердечно-сосудистыми событиями [166]. Варианты в гене *SCARB1* могут воздействовать на плазменные уровни аполипопротеина В в дополнение к своей роли в регуляции метаболизма ХС-ЛВП [167].

Rs5888 расположен в 8 экзоне гена *SCARB1* и приводит к синонимичной замене аминокислот А350А в белке, вызывая изменения активности сплайсинга [168]. Аллель Т rs5888 ассоциирован с более низким риском ишемической болезни сердца [169] и более низкими уровнями триглицеридов в плазме, особенно у мужчин [170]. Рецептор SRB1 является многофункциональным и участвует в поглощении каротиноидов пищи [164]. Аллель Т rs5888 также ассоциирован с более низкими уровнями жирорастворимых витаминов в плазме [171].

1.3.11 Ген *SREBF2*

Ген *SREBF2* расположен на хромосоме 22q13 [172]. Белок, связывающий стерол-регулирующий элемент 2 (*SREBF2*) активизирует транскрипцию нескольких генов (рецептора ЛНП, ГМГКоА–редуктазы, ГМГКоА–синтазы и др.), контролируя гомеостаз холестерина [173]. *SREBF2* также участвует в контроле уровня холестерина посредством посттранскрипционной репрессии *ABCA1*, через *microRNA* (miR33) включенной в пределах интрона 17 гена *SREBF2* [174, 175].

SREBF2 синтезируется в форме предшественника preSREBP, расположен в цитоплазме и связан с мембранами эндоплазматического ретикулума. Белки *SREBF1* и *SREBF2* структурно связаны. Для функциональной активности белка *SREBF2* необходимо взаимодействие с белком SCAP (*SREBF cleavage-activating*

protein), кодируемым геном *SCAP*. Свободные жирные кислоты оказывают влияние на экспрессию и активность SREBF [176].

Для варианта rs2228314 (G1784C, Gly595Ala) была показана ассоциация с острым коронарным синдромом (ОКС), различающаяся в зависимости от популяции. В популяции Мексики аллель G был ассоциирован с риском развития ОКС [177]. В другом исследовании в популяции Франции показано, что аллель C rs2228314 ассоциирован утолщением интима-медиа и ранним атеросклерозом сонных артерий [178]. В популяциях Швейцарии и Израиля аллель C rs2228314 ассоциировался с гиперхолестеринемией [179]. В отличие от этих данных, исследования в азиатских популяциях сообщают об отсутствии ассоциации rs2228314 с ишемической болезнью сердца [180, 181].

1.4 Генетические детерминанты субфракций липопротеинов низкой плотности

В развитие и прогрессировании атеросклероза важную роль играют модифицированные липопротеины низкой плотности [182, 183]. Субфракции ЛНП отличаются размером и плотностью частиц и в разной степени связаны с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [184].

ЛНП представляют собой гетерогенный класс липопротеинов, поскольку внутри их градиента плотности (1,019-1,063 г/мл) выявлены субпопуляции частиц, различных как по физико-химическим, так и по биологическим свойствам [184].

Согласно современным представлениям, существует несколько механизмов образования субфракций ЛНП. В результате действия липопротеинлипазы на поверхности сосудистого эндотелия происходит гидролиз триглицеридов липопротеинов очень низкой плотности. Последние превращаются вначале в меньшие по размеру и обогащенные холестерином, липопротеины промежуточной плотности, а затем в ЛНП, богатые холестерином. Внутрисосудистое образование ЛНП из печеночных ЛОНП является ключевой чертой метаболизма триглицерид-богатых липопротеинов [185]. Мелкие частицы ЛОНП длительно циркулируют в

крови, подвергаясь процессам липолитической деградации, и превращаются в субфракции ЛНП [186, 187]. Гетерогенность субфракций ЛНП является результатом нескольких путей:

- катаболизм различных предшественников ЛОНП и ЛПП,
- метаболическое ремоделирование,
- прямое производство [186].

Идентифицировано более 15 субфракций ЛНП, плотностью от 1,019 до 1,063 г/мл [184]. Субфракции ЛНП отличаются по содержанию липидов и белков, а также по химическому составу (ХС и его эфирам, ТГ, фосфолипидам, витамину Е). С увеличением плотности субфракций ЛНП увеличивается содержание в них свободного холестерина и его эфиров, а окислительная модификация превращает ЛНП в атерогенные частицы, которые вызывают воспалительные реакции [183, 184].

По структуре и различиям метаболизма ЛНП могут быть разделены на 3 большие субфракции. Большие легкие частицы ЛНП являются предшественниками средних и мелких плотных частиц ЛНП у здоровых людей [189]. Среди этих субфракций средние ЛНП (плотность 1,030-1,036 г/мл) обладают оптимальной рецептор-связывающей конформацией и в плазме крови ЛНП преимущественно катаболизируются за счет средних частиц ЛНП [189]. Таким образом, средние субфракции ЛНП играют важную роль в гомеостазе холестерина. Исследования по изучению процесса переноса эфиров холестерина от ЛВП к апоВ-содержащим липопротеинам показали, что средние субфракции ЛНП являются лучшими акцепторами эфиров холестерина и, поэтому, они играют скорее защитную роль, чем проатерогенную. По скорости деградации субфракции ЛНП располагаются следующим образом: средние > легкие > плотные [185]. Все эти данные говорят о том, что средние ЛНП не обладают атерогенными свойствами [189].

Для мелких плотных частиц ЛНП характерно низкое содержание сиаловой кислоты. Мелкие плотные ЛНП, в отличие от больших легких и средних частиц ЛНП, имеют более высокую электрофоретическую подвижность, более отрицательный заряд [189]. Эта субфракция ЛНП длительное время циркулирует в

крови и вызывает накопление холестерина в гладкомышечных клетках [183, 186]. Мелкие плотные частицы ЛНП считают наиболее атерогенными.

Проведено несколько исследований субфракций ЛНП у пациентов с факторами риска ИБС. При дислипотеинемии, такой как комбинированная гиперлипидемия и гипертриглицеридемия выявлена повышенная концентрация в крови мелких плотных ЛНП или их преобладание по отношению к легким и средним субфракциям ЛНП [183]. Обнаружена высокая концентрация мелких плотных, наиболее атерогенных частиц ЛНП при гипертриглицеридемии [184]. Преобладание мелких плотных частиц ЛНП может быть объяснено не только повышенной концентрацией ТГ, но и другими факторами, включая генетические. Генетические детерминанты размера частиц ЛНП могут быть одним из факторов повышения уровня мелких плотных ЛНП даже при нормальном уровне ТГ крови у больных ИБС. При семейной комбинированной гиперлипидемии показано повышенное количество мелких плотных, ХС-обогащенных ЛНП со сниженной резистентностью к окислению в сравнении со здоровыми людьми [190].

1.5 Семейная гиперхолестеринемия

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) – заболевание, причиной которого являются генетические дефекты, снижающие скорость удаления липопротеинов низкой плотности из кровотока и значительно повышающие концентрации холестерина крови [191]. Гены, патогенные варианты которых определяют фенотип СГХС в подавляющем большинстве случаев, представлены в таблице 1.3. Семейная гиперхолестеринемия обычно возникает из-за мутаций потери функции в гене *LDLR*, кодирующем рецептор липопротеинов низкой плотности, и генах, кодирующих белки, которые взаимодействуют с рецептором: *APOB*, *PCSK9* и *LDLRAP1* [5].

Семейная гиперхолестеринемия – широко распространенное врожденное метаболическое нарушение [192, 193].

Таблица 1.3 – Гены, определяющие фенотип семейной гиперхолестеринемии

Символ гена	Название гена	Частота (%)
Аутосомно-доминантная форма		
<i>LDLR</i>	ген рецептора липопротеинов низкой плотности	79-85
<i>APOB</i>	ген аполипопротеина В	5-7
<i>PCSK9</i>	ген пропротеин конвертазы субтилизин/кексин тип 9	<5
Аутосомно-рецессивная форма		
<i>LDLRAP1</i>	ген белка-адаптера рецептора ЛНП	<1

У больных СГХС выявляют с рождения значительное повышение общего холестерина сыворотки, повышение холестерина липопротеинов низкой плотности при нормальном или умеренно повышенном уровне триглицеридов [194]. Сухожильные ксантомы являются одним из признаков СГХС и выявляются у 25-30% пациентов, также у пациентов с СГХС могут быть выявлены ксантелазмы в возрасте до 25 лет и/или липоидная дуга роговицы в возрасте до 45 лет. Для СГХ характерно раннее развитие осложнений: ишемической болезни сердца и атеросклеротического поражения сосудов мозга и нижних конечностей [195]. ИБС у пациентов с СГХС проявляется в возрасте до 45 лет у мужчин и до 55 лет у женщин [196]. Несмотря на распространенность этого заболевания и доступность эффективных методов лечения, СГХС часто остается не диагностированной и не леченной, особенно у детей. Для своевременной диагностики СГХС предложено использовать метод каскадного генетического скрининга [197].

Каскадный генетический скрининг – поэтапная идентификация пациентов с СГХС. При выявлении повышенного уровня общего холестерина и холестерина ЛНП у пациента проводится сбор семейного анамнеза и анализ клинических проявлений. В случае диагноза «вероятная» или «определенная» СГХС по клиническим критериям [Geneva: World Health Organization; 1999] пациенту назначается молекулярно-генетическое исследование. Каскадный скрининг включает определение содержания липидов у всех родственников пробанда первой линии родства. При подтверждении молекулярно-генетическими методами диагноза СГХС у пациента, проводят генетический скрининг его родственников [198]. По мере выявления новых пациентов с СГХС, их родственники также

обследуются. Каскадный скрининг наиболее эффективный способ диагностики, ранее не диагностированной СГХС.

По рекомендациям Европейского общества Атеросклероза (European Atherosclerosis Society) скрининг на содержание холестерина должен быть проведен всем лицам в популяции до достижения ими возраста 20 лет. В случае семейного анамнеза СГХС или раннего развития ИБС, определение уровня общего холестерина сыворотки рекомендовано с возраста 2 лет [199].

Каскадный скрининг получил официальное признание ВОЗ с этической точки зрения: заболевание представляет серьезную проблему для здоровья, доступен диагностический тест, доступны превентивные меры [198].

Отрицательный результат генетического скрининга мутаций гена *LDLR* не исключает СГХС (около 40-60% случаев). В случае отсутствия мутаций в гене *LDLR* выполняется секвенирование генов *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* [200, 201].

Проведено сравнение эффективности каскадного генетического скрининга против фенотипического скрининга: по данным литературы показано, что от 38% (Нидерланды) до 53% (Норвегия) пациентов не получали липид-снижающую терапию до молекулярно-генетического подтверждения диагноза СГХС (в 93% и 89% получают лечение после постановки диагноза, соответственно). Менее чем 10% пациентов получали адекватную липид-снижающую терапию до проведения генетического скрининга СГХС [202-204]. Экономически оправдано проведение поэтапного скрининга всем молодым людям до 16 лет с последующим назначением лечения в случае диагностики СГХС [205].

PCSK9 играет важную регулирующую роль в гомеостазе холестерина. Фермент пропротеин конвертаза субтилизин/кексина типа 9, который кодируется геном *PCSK9*, взаимодействуя с рецептором ЛНП на поверхности гепатоцита, приводит к интернализации этого комплекса и лизосомальной деградации, что приводит к повышению уровня ЛНП в крови [206]. Корреляция между *PCSK9* и уровнем холестерина ЛНП связана, в частности, с генетической изменчивостью в гене *PCSK9* [207].

Мутации в гене *PCSK9* встречаются во всех 12 экзонах гена. Большую часть мутаций представляют миссенс мутации, также выявлен ряд синонимичных замен, нонсенс-мутации, мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания, делеции и инсерции кодона, описано несколько патогенных интронных вариантов [206].

Мутации в гене *PCSK9* обладают разнонаправленным действием на уровень холестерина липопротеинов низкой плотности, приводя к повышению или снижению средних значений холестерина липопротеинов низкой плотности в крови. Они могут быть разделены на две категории по отношению к результату их действия – мутации усиления функции или “gain-of-function” и мутации потери функции или “loss-of-function”. С помощью клеточных и животных моделей было показано, что мутации типа “gain-of-function” в *PCSK9* снижают количество рецепторов к ЛНП в печени, что приводит к высокому уровню холестерина ЛНП в крови и повышенному риску ИБС [208]. Мутации “gain-of-function” *PCSK9* вызывают редкую форму аутосомно-доминантной семейной гиперхолестеринемии [206], то есть являются третьей причиной семейной гиперхолестеринемии, после мутаций в генах *LDLR* и *APOB* [207]. Аутосомно-доминантная СГ, обусловленная мутациями “gain-of-function” в гене *PCSK9*, клинически проявляется не только повышением уровня ОХС и ХС-ЛНП. Для нее характерны сухожильные ксантомы, ИБС, инфаркт миокарда и инсульт в молодом возрасте. Резко повышается продукция апоВ-100, отмечена низкая скорость превращения ЛОНП и ЛПП [209]. Уровень *PCSK9* независимо связан с изменениями субфракций липопротеинов и развитием ИБС [210].

Мутации “loss-of-function”, связаны с низкими уровнями общего холестерина и снижением риска ИБС. При наличии мутаций R46L, G106R, N157K и R237W уровень рецепторов к ЛНП на клеточной поверхности увеличивался на 16%, а интернализация ЛНП на 35% по сравнению с диким типом *PCSK9* [211, 212]. В нескольких исследованиях мутация типа “loss-of-function” R46L была ассоциирована со снижением ХС-ЛНП и со снижением на 47% риска развития ИБС [211, 213-215]. Пациенты с мутациями *PCSK9* типа “loss-of-function”, как правило, здоровы, без других очевидных метаболических нарушений [211, 216]. Тем не

менее, есть некоторые доказательства того, что PCSK9 может играть определенную роль в других физиологических процессах и, следовательно, его ингибирование или подавление может иметь неблагоприятные последствия. Возможно, PCSK9 участвует в поддержании нормальной функции панкреатических островков. Данные, представленные в докладе Mbikaу и соавт., показывают, что PCSK9-дефицитные мыши обладают мягкой хронической гипергликемией и нарушенной толерантностью к глюкозе в связи с отсутствием PCSK9-опосредованной регуляции функции клеток островков поджелудочной железы [217].

Мутации гена *PCSK9* неравномерно распределены в различных этнических группах. Мутации потери функции чаще встречаются у лиц африканского происхождения [207]. Мутации, ассоциированные с семейной гиперхолестеринемией, встречаются реже клинически не значимых ОНП в большинстве популяций, но несмотря на это, их биологический, клинический и функциональный эффект значителен в метаболизме холестерина.

В 20-40% случаев при молекулярно-генетическом исследовании не удается определить изменения в вышеназванных генах [218]. В ряде случаев повышенная концентрация ХС-ЛНП может иметь полигенное наследование у пациентов с СГХС [219]. Средняя скорость обнаружения новых генов, ассоциированных с СГХС, составляет около одного в десятилетие с 1970-х годов [220].

Белок STAP1 (signal-transducing adaptor protein family member1) идентифицирован в иммунных клетках. Его максимальная экспрессия показана в лимфатических узлах, аппендиксе и селезёнке. Белок STAP1 кодируется геном *STAP1*, расположенным на хромосоме 4 в локусе 4q13.2 и содержащим 10 экзонов [221]. Белок STAP1, в зависимости от изоформы мРНК, состоит из 295 или 314 аминокислот, имеет несколько сайтов фосфорилирования, содержит N-концевой пролин - богатый участок (Pro6-Pro11), за которым следуют плекстрин-гомологичный (PH) (Leu24 - Thr152) и Src - гомологичный 2 (SH2) (Asn173-Cys269) домены. PH - домен отвечает за связь белка с определенными фосфолипидами, позволяя ему закрепляться на клеточной мембране. SH2 - домены отвечают за

связывание белка с фосфотирозин-содержащими последовательностями, опосредуя белок - белковые взаимодействия [222, 223].

В ходе анализа экспрессии лейкоцитарных генов с уровнем липидов плазмы было показано, что *STAP1* – один из генов гуморального иммунного ответа, экспрессия которых положительно коррелирует с концентрацией липидов [224]. При генетическом картировании пациентов с аутосомно-доминантной гиперхолестеринемией из пяти голландских семей был выявлен участок на хромосоме 4, с которым сцеплено заболевание. В результате анализа была выявлена мутация p.Glu97Asp (rs779392825). В ходе секвенирования кодирующих районов *STAP1* у 400 неродственных пробандов с семейной гиперхолестеринемией без мутаций в известных генах был обнаружен ещё один носитель p.Glu97Asp и 3 дополнительных мутации p.Leu69Ser (c.206T>C, rs938523789), p.Ile71Thr (c.212T>C, rs141647940), и p.Asp207Asn (c.619G>A, rs146545610). Все найденные мутации находились в высоко консервативных локусах [225].

В выборке пациентов с гиперхолестеринемией из Германии в *STAP1* была выявлена новая мутация c.139A>G (p.(T47A), rs793888522), сегрегировавшая в семье пациента с инфарктом миокарда [226]. В ходе скрининга пациентов с повышенным ХС-ЛНП в Испании в семье одного пациента была выявлена мутация c.291G>C, p.(Glu97Asp) в *STAP1* [227]. Также в Испании у пациента с дислипидемией и его родственников выявлена гетерозиготная мутация rs199787258 гена *STAP1* (c.526C>T; p.Pro176Ser). Биоинформационный анализ последовательности мутантного *STAP1* показал, что замена неполярного пролина на гидроксильный серин полностью меняет структуру SH2 домена белка [228].

В ходе анализа пациентов младше 35 лет с семейной гиперхолестеринемией в Китае у одного из них выявили новую мутацию c.596A>G p.Asn199Ser в *STAP1* [239].

Пациенты с мутациями в гене *STAP1* имеют менее выраженный патологический фенотип, чем носители мутаций в генах *APOB* и *LDLR*. При этом носителей мутаций в *STAP1* отличает достоверно повышенный уровень

триглицеридов по сравнению с носителями мутаций в вышеупомянутых генах [224, 225].

С другой стороны, было показано, что варианты p.Leu69Ser, p.Ile71Thr и p.Glu97Asp гена *STAP1* не связаны с повышенным уровнем холестерина ЛНП и не влияют на гомеостаз ХС-ЛНП в печени [230]. Отсутствие статистически значимой ассоциации вариантов гена *STAP1* с уровнями показателей липидов крови было продемонстрировано в исследовании М. Danyel с соавт. [231]. Эти работы показывают, что замены в гене *STAP1*, скорее всего, не являются причиной развития СГХС, и его роль в регуляции липидного обмена требует дальнейшего изучения.

Ген *CYP7A1* кодирует синтезирующийся в клетках печени белок 1 подсемейства А семейства 7 цитохрома Р450, имеющий функцию холестерин 7-альфа монооксигеназы. Этот фермент катализирует первую стадию основного пути катаболизма холестерина в организме – превращение его в желчные кислоты, присоединяя гидроксильную группу в позиции 7-альфа холестерина. Желчные кислоты, хотя и необходимы для усвоения жиров, потенциально токсичны для клеток организма, т.к. являются детергентами. Их концентрация жёстко регулируется, в том числе и по принципу обратной связи [232]. Выявлено большое число факторов, определяющих активность *CYP7A1* в печени.

Описано несколько полиморфных сайтов *CYP7A1*, которые ассоциированы с уровнем общего холестерина и ХС-ЛНП, а также с предрасположенностью к заболеваниям, связанным с обменом холестерина. Rs10957057 в 3' области *CYP7A1* ассоциирован с уровнем ОХС и ХС-ЛНП в латиноамериканских популяциях [233]. Rs7833904, расположенный в 5' -нетранслируемой области *CYP7A1*, модифицирует риск ишемической болезни сердца, особенно у мужчин [234]. Для rs72647413 (T193I) и rs139396617 (R260L) показана ассоциация с уровнем ХС-ЛНП [235].

Ген *LIPA* кодирует лизосомальную кислую липазу (липаза А, гидролаза эфиров холестерина). Липаза А участвует в гидролизе триглицеридов и сложных эфиров холестерина, доставляемых в лизосомы посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза частиц липопротеинов низкой плотности (ЛНП),

обеспечивая холестерин для роста клеток и функционирования мембран. Дефицит липазы A наследуется аутосомно-рецессивно. Патогенные варианты в этом гене могут вызывать в зависимости от зиготности и степени изменения белка болезнь Вольмана, проявляющуюся в первые месяцы после рождения, и болезнь накопления эфиров холестерина, проявляющуюся позже, в детстве или в зрелом возрасте [236]. Эти заболевания характеризуются внутриклеточным накоплением эфиров холестерина и изменениями в контроле синтеза холестерина. Отмечают разнообразие фенотипических проявлений патогенных вариантов в гене *LIPA* [236-238]. Наиболее распространёнными проявлениями дефицита липазы A являются гепатомегалия и типичный липидный профиль сыворотки: высокие уровни общего холестерина, ХС-ЛНП и триглицеридов, низкая концентрация ХС-ЛВП. Патогенные варианты в *LIPA* также ассоциированы с ишемической болезнью сердца и семейной гиперхолестеринемией [236, 239].

Одним из наиболее распространённых вариантов в *LIPA*, для которого показана функциональная значимость, является Thr16Pro (rs1051338). Эта замена приводит к снижению количества фермента без изменения его ферментативной активности [239]. У пациентов с болезнью накопления эфиров холестерина самой распространённой (более 50% случаев) является вариант rs116928232 (894G>A, Q298Q) изменяющий сайт сплайсинга и отсутствию экзона 8 с потерей 24 аминокислот [240, 241]. Распространённость rs116928232 в европеоидных популяциях составляет от 1 на 200 до 1 на 1000 человек [240, 242]. У пациентов семейной гиперхолестеринемией выявлены редкие перестройки, в том числе протяженные делеции участка интрона 3 и экзона 4, в гене *LIPA* [242], варианты, приводящие к сдвигу рамки считывания с.229+3A>C [238] и более 50 миссенс и нонсенс мутаций, а так же замены в промоторе и сайтах сплайсинга с предсказанным патогенным эффектом [237, 238, 243, 244].

ABCG5 и *ABCG8* (ATP binding cassette subfamily G member 5 и 8) являются субъединицами мембранного транспортёра стиролов. Кодированные их гены расположены на противоположных цепях ДНК 5'-концами друг к другу в локусе 2p21 хромосомы 2, расстояние между их стартовыми кодонами 374 п.н. На этом

участке находится их общий промотор, содержащий регуляторные элементы HNF4 α , LRH-1, NF κ B, FOXO1 [245, 246]. Общий энхансер генов картирован на расстоянии 100000 п.н. от промотора [247]. С этим участком сцеплено аутосомно-рецессивное заболевание ситостеролемия, проявляющееся в накоплении ксеностеролов, макротромбоцитопении и ранней ишемической болезни сердца [247]. Бета-ситостерол является самым распространённым фитостеролом, а фитостеролы – самыми распространёнными ксеностеролами в организме человека.

Ген *ABCG5* содержит 15 экзонов [248], ген *ABCG8* также содержит 15 экзонов [249]. Оба белка состоят из магний-зависимого АТФ-связывающего домена на N-конце, содержащего консервативные пептидные мотивы Walker A и B, и трансмембранного домена, включающего 6 трансмембранных спиралей. На шестой трансмембранной спирали *ABCG8* находится последовательность для распознавания холестерина, благодаря которой именно он в паре *ABCG5/G8* может являться сенсором уровня холестерина в ходе его экскреции [250]. Варианты R389, R419, N437, I523, R550, C600, Q604, M622 в *ABCG5* и T400, R405, L501, R543, L572, G574, G575, L596 в *ABCG8*, предсказаны как вероятно патогенные, приводящие к нарушению транспорта холестерина из клеток [250, 251]. В различных этнических группах показано, что уровень ситостерола выше у носителей вариантов G574R (rs137852988), M429V (rs147194762) [252, 253]. В выборке пациентов с семейной гиперхолестеринемией у носителей аллеля Q604E (rs6720173) *ABCG5* выявлен пониженный уровень триглицеридов и холестерина липопротеинов очень низкой плотности, а носительство интронных вариантов rs4131229A>G, rs4148189C>T, rs4289236 G>A этого гена было ассоциировано с более высоким уровнем общего холестерина и триглицеридов и более низким уровнем ХС-ЛВП только у курящих [254]. В Испании у пациентов с гиперхолестеринемией были выявлены варианты rs146534033, rs139264483, rs141828689, rs552803459, rs552803459 в *ABCG5* и rs376069170 в *ABCG8* [255]. В связи с тем, что в локусе 2p21 выявлено неравновесие по сцеплению и наблюдается перекрывание регуляторных областей и транскриптов четырех генов, ассоциации вариантов в генах *ABCG5* и *ABCG8* с

фенотипическими признаками могут отличаться между этническими группами [256].

Ген *PNPLA5* (Patatin Like Phospholipase Domain Containing 5) относится к семейству пататин-подобных фосфолипаз, участвующих в энергетическом обмене, гидролизе триглицеридов, регуляции метаболизма адипозной ткани [258]. В ходе полноэкзомного анализа лиц с экстремально низкими и экстремально высокими показателями ХС-ЛНП были отобраны гены, редкие и низкочастотные варианты которых статистически значимо чаще встречались в этих выборках. Были обнаружены редкие (частота ниже 0.001) потенциально патогенные варианты гена *PNPLA5*, большинство из них встречаются в группе с повышенным значением ХС-ЛНП: rs199891914, rs201608516, rs377273512, rs145976734, rs374016542, rs147929574, rs149836456, rs181818400 гена *PNPLA5*. Вариант rs147702402 был выявлен в группе с пониженным ХС-ЛНП [258].

Молекулярно-генетический диагноз СГХС сегодня является определяющим при назначении пациентам адекватной терапии современными классами липид снижающих препаратов. В 2018 году Familial Hypercholesterolemia Foundation инициировал оценку полезности генетического тестирования СГХС. Экспертная группа рекомендовала генетическое тестирование семейной гиперхолестеринемии как стандарт оказания помощи пациентам с определенной или вероятной семейной гиперхолестеринемией, а также их родственникам из группы риска [259]. Тестирование должно включать гены, кодирующие рецептор липопротеинов низкой плотности (*LDLR*), аполипопротеин В (*APOB*) и пропротеин-конвертазу субтилизин / кексин 9 (*PCSK9*), анализ других генов также может потребоваться исходя из фенотипа пациента. Ожидаемые результаты от применения генетического тестирования СГХС включают точность диагностики, эффективность каскадного тестирования у родственников пациентов, начало терапии в более раннем возрасте и точную стратификацию сердечно-сосудистого риска [259]. У пациентов с высоким уровнем ХС-ЛНП и подтвержденной мутацией в одном из вышеназванных генов, ассоциированных с СГХС, показано повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний в 22 раза [260]. Своевременно

поставленный диагноз позволяет не только снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у пробанда, но и обследовать его родственников с целью диагностики и первичной профилактики ССЗ.

В 2019 году Luis Masana и соавт. предложили от имени Expert group from the Spanish Arteriosclerosis Society новую классификацию СГХС. Предпосылками для создания новой классификации стали несоответствия в клинической и генетической диагностике семейной гиперхолестеринемии: у лиц с клиническим диагнозом определенная СГХС не находят мутаций в генах, ассоциированных с СГХС; вариабельность клинической картины СГХС; высокий сосудистый риск у пациентов с моногенной и полигенной СГХС; использование в лечении заболевания новых групп препаратов для пациентов с подтвержденной молекулярно-генетическими методами СГХС [261].

Клиническая классификация пациентов с СГХС от Expert group from the Spanish Arteriosclerosis Society, 2019:

1 группа – гетерозиготная семейная гиперхолестеринемия: пациенты с «определенной» СГХ по клиническим критериям и функциональной мутацией в одном из аллелей генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*;

2 группа – гомозиготная семейная гиперхолестеринемия: мутации затрагивают оба аллеля генов или диагностирована компаунд гетерозигота генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*;

3 группа – полигенная семейная гиперхолестеринемия: у пациентов с «определенной» СГХ по клиническим критериям, без функционально значимых мутаций в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* (следует отличать от несемейной, многофакторной гиперхолестеринемии);

4 группа - семейная гиперхолестеринемия в сочетании с гипертриглицеридемией: семейная комбинированная гиперлипидемия у пациентов с «определенной» СГХ по клиническим критериям с ассоциированной гипертриглицеридемией.

Все семьи, в которых выявлены патогенные варианты, ассоциированные с семейной гиперхолестеринемией, должны быть целенаправленно обследованы с

использованием метода каскадного генетического скрининга для выявления новых случаев СГХС.

1.6 Методы высокотехнологичного секвенирования в изучении молекулярно-генетических детерминант гиперхолестеринемии

Существует ряд стратегий, используемых для глобального профилирования генома, транскриптома, микроРНКома, метилома ДНК и метаболома, которые важны для определения биологических и патофизиологических механизмов эндотелиальной дисфункции и атеросклероза [262-266]. Глобальные наборы биологических данных на нескольких иерархических уровнях (ДНК, РНК, белков и метаболитов) используются для изучения механизмов патогенетических процессов, лежащих в основе атерогенеза. Совокупность эпигеномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных исследований по-прежнему актуальна для формирования сетей сигнальной трансдукции у человека [267, 268].

В клинической практике методы высокотехнологичного секвенирования могут быть использованы:

- для выявления генетической этиологии неизвестных фенотипов;
- для определения причин заболеваний с выраженной генетической гетерогенностью;
- для поиска новых вариантов, патогномоничных для заболевания;
- для диагностики заболеваний, для которого нет специфического генетического теста.

Современные методы диагностики позволяют оценить степень распространения атеросклеротического повреждения и локализацию отдельных бляшек, но не могут прогнозировать ее поведение. Острое коронарное событие может быть первым проявлением ишемической болезни сердца с асимптомным течением или может произойти на фоне стабильного течения заболевания с отсутствием клинических признаков нестабильного состояния. Для ранней диагностики признаков дестабилизации атеросклеротической бляшки и выбора

тактики оперативного вмешательства используют методы визуализации атеросклеротических бляшек инвазивными или неинвазивными способами и/или определение биологических маркеров нестабильной атеросклеротической бляшки. Изображения, полученные при оптической когерентной томографии, или молекулярная визуализация с использованием целевых маркеров позволяет проанализировать морфологию бляшки, ее состав, степень воспаления. Визуализация в кардиологии используется для оценки фенотипа бляшек высокого риска [269, 270]. К инвазивным методам визуализирующих исследования нестабильных атеросклеротических бляшек относятся внутрисосудистое ультразвуковое исследование (УЗИ), оптическая когерентная томография, ангиоскопия, внутрисосудистая магнитно-резонансная томография (МРТ), к неинвазивным визуализирующим методам – МРТ, мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), ультразвуковое дуплексное сканирование (коронарные артерии и сонные артерии).

Высокая вариабельность процессов, происходящих в атеросклеротической бляшке, в зависимости от стадии бляшки и ее локализации, активно влияет на дифференциальную экспрессию генов [271, 272]; в исследованиях также было показано различие в экспрессии генов в атеросклеротических бляшках, находящихся в разных артериальных руслах [273].

Детекция предшествующих белкам транскриптов является информативным показателем патологических процессов и позволяет диагностировать и оценить динамику развития заболевания до возникновения более поздних фенотипических проявлений (детектируемые белковые продукты, продукты метаболизма, пептиды).

В течение последнего десятилетия проводится анализ экспрессии генов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена. Транскриптомный анализ макрофагов, способствующих образованию сложных и нестабильных бляшек путем поддержания провоспалительной микросреды, показал особенности их активации и функции [274]. Исследования активации макрофагов выявили изменения в генной транскрипции, индуцированной 28 различными стимулами или

их комбинациями. Определено 49 генов, которые активируются в макрофагах в ответ стимулы транскрипционных факторов [275].

Изучение профилей коронарной и некоронарной эндотелиальной транскрипции позволило определить транскрипты, связанные с повышением окислительного стресса в коронарных артериях [276]. Также были получены первые данные изучения бляшек и периферической крови, показавшие важность анализа транскрипционных факторов для определения типов нестабильной бляшки [277]. Изучение транскриптома атеросклеротической бляшки на разных этапах ее развития и выявление тканеспецифических транскриптов, маркирующих процессы деструкции, является актуальным направлением в разработке методов диагностики развития атерогенеза.

Изучения совокупности молекулярно-генетических изменений, характерных для гиперхолестеринемии и развития атеросклеротического процесса, актуально не только для научных целей, но и для практического применения: верификации диагноза пациента, обследование членов семьи пациента, первичной профилактики заболевания, раннего начала и адекватности проводимой терапии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Общая характеристика обследованных групп

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», в Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины (НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН). Все этапы исследования одобрены Этическим комитетом НИИТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН: № 01 от 14.09.2005 г., № 7, от 22.06.2008 г. и №68 от 04.06.2019 г. От каждого участника исследования получено информированное согласие, для лиц младше 18 лет информированное согласие подписывали родители.

В исследование включены группа из популяции взрослого населения г. Новосибирска, Западная Сибирь, Россия ($n=909$; 50% мужчины; возраст 45-69 лет; средний возраст $53,8 \pm 7$ лет) и две клинических группы пациентов: с семейной гиперхолестеринемией Западная Сибирь, Россия (лица старше 18 лет $n=69$; 26% мужчины; возраст 20-73 лет; средний возраст $45,4 \pm 13,5$ лет; лица младше 18 лет $n=11$; 55% мужчины; возраст 7-17 лет; средний возраст $12,7 \pm 3,9$ лет) и коронарным атеросклерозом Западная Сибирь, Россия ($n=30$; 100% мужчины; возраст 40-70 лет; средний возраст $53,0 \pm 3,8$ лет) (рисунок 2.1).

Особенность настоящего исследования заключается в генотипировании всех вышеперечисленных групп в одной лаборатории по стандартным методикам. Группы сформированы из представителей одной популяции, что исключает межпопуляционные различия, которые затрудняют оценку функциональной значимости изучаемого варианта. На материале популяционной группы выполнены исследования частоты встречаемости ряда распространенных вариантов в генах липидного обмена и ассоциативные исследования с биохимическими показателями; в группе пациентов с диагнозом семейная

гиперхолестеринемия выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование генов, ассоциированных с развитием СГХС и генов липидного обмена; в группе пациентов с коронарным атеросклерозом выполнено полноэкзомное секвенирование образцов ДНК и полногеномное секвенирование образцов РНК с анализом 43 генов, ассоциированных с СГХС и нарушениями липидного обмена.

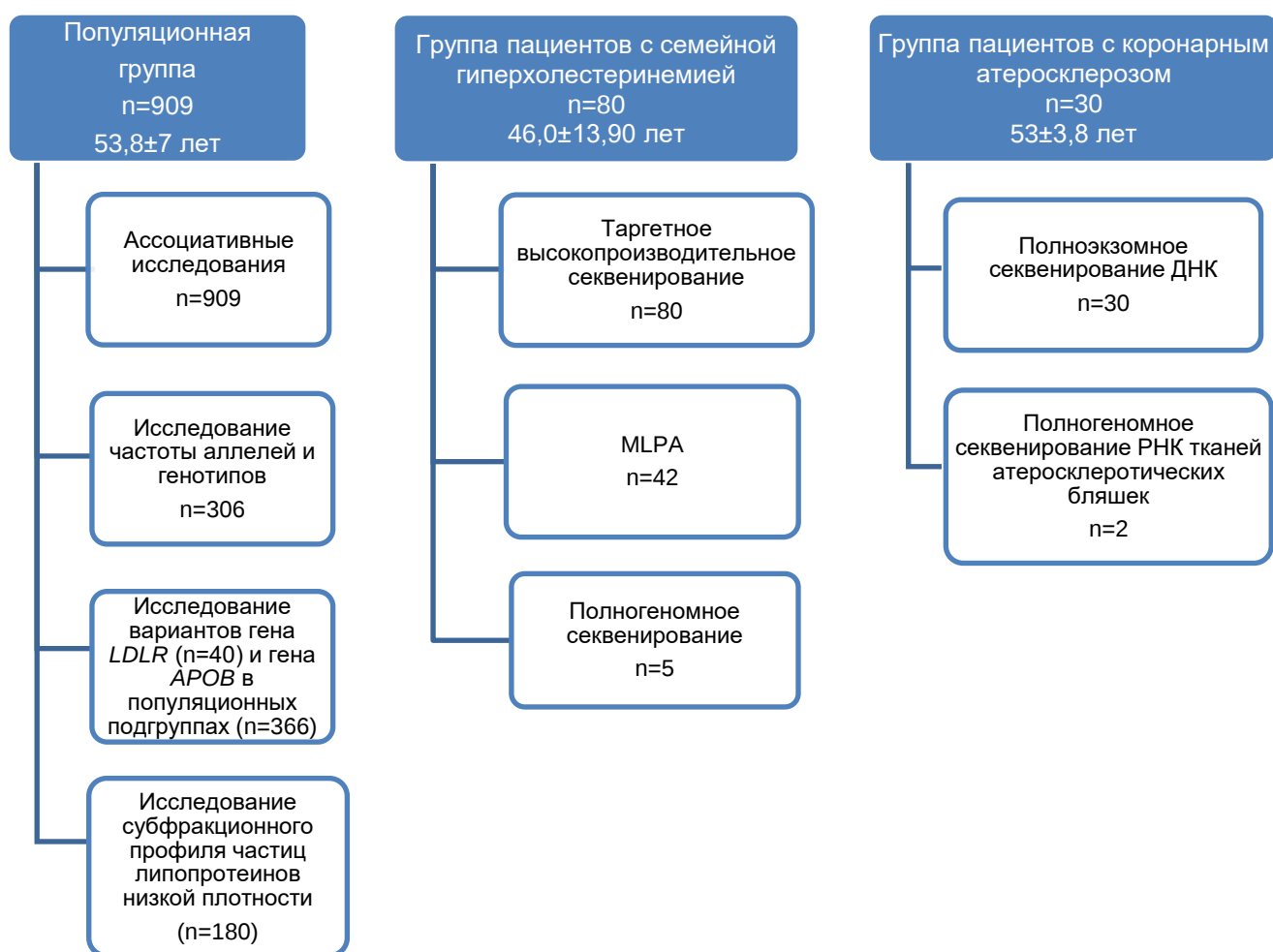


Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.1.1 Популяционная группа взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия)

Выборка из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия) сформирована на базе одномоментного эпидемиологического обследования взрослого населения в двух административных районах г. Новосибирска (Западная Сибирь). Обследование выполнено в рамках Международного многоцентрового проекта HAPIEE – «Детерминанты сердечно-сосудистых заболеваний в Восточной Европе» (головной центр в г. Лондон, Великобритания; принципиальные исследователи в г. Новосибирск, Россия – академик РАН, профессор, д.м.н. Никитин Ю.П. и профессор, д.м.н. Малютина С.К.) [278]. Состав жителей обследованных районов типичен для г. Новосибирска по национальному, возрастному составу и занятости населения. В каждом из выбранных районов города с помощью таблицы случайных чисел была сформирована репрезентативная выборка населения 45-69 лет – 9600 человек. В каждом районе было обследовано по 4800 человек. Во время скрининга проводился забор крови для биохимических анализов и выделения ДНК. Для последующего генетического анализа было доступно 9360 проб. Средний возраст обследованных лиц составил $53,8 \pm 7$ лет, в этническом отношении более 90% обследованных составили европеоиды.

Для молекулярно-генетического исследования нарушений липидного обмена из основной выборки были отобраны методом случайных чисел 936 человек, что составило 10% обследованных лиц.

Мощность выборки рассчитывалась при помощи программы «Genetic Power Calculator» для анализа размера выборки генетических ассоциативных исследований с различной частотой редких аллелей (MAF) и относительных генетических рисков (GRR) [279]. Относительные риски от 1,1 до 1,3 находятся в диапазоне, который можно ожидать в исследованиях генетических ассоциаций мультифакториальных заболеваний.

При применении программы минимальный необходимый объем выборки для проведения молекулярно-генетического анализа популяции взрослого населения г. Новосибирска составил 396 человек, с относительным генетическим риском 1,3 для частоты редкого аллеля более 5%. Для проведения молекулярно-генетического исследования и анализа изучаемых факторов риска оказались доступны – 909 человек (9,7% от основной выборки). Исследование имеет ограничение в связи с тем, что популяционный фрагмент изучался для возраста 45-69 лет.

Обследование участников исследования из популяционной выборки проводилось бригадой врачей по стандартным методикам и проходило в специально оборудованных центрах (кабинеты регистрации обследуемых, кабинет для заполнения анкет, кабинеты специалистов (терапевт, кардиолог, гастроэнтеролог, невропатолог, диетолог), процедурный кабинет, кабинет функциональных методов обследования и антропометрии). В программу скринингового (эпидемиологического) обследования популяционной выборки входили: демографические и социальные данные, опрос о привычке курения и употреблении алкоголя, диетологический опрос, история хронических заболеваний, употребление медикаментов, кардиологический опрос по Роуз, антропометрия, 3-х кратное измерение АД, спирометрия, запись ЭКГ, выявление «Определенной ИБС» по валидизированным эпидемиологическим (либо ИМ, определенный по ЭКГ, либо безболевая форма ИБС по ЭКГ, либо стабильная стенокардия напряжения ФК II-IV по опроснику Роуз) и клинико-функциональным критериям (по данным расшифровки ЭКГ по Миннесотскому коду) и другие обследования.

Артериальное давление измеряли на ведущей руке в положении сидя после 5-10 минутного отдыха с помощью ртутного тонометра с регистрацией среднего значения трех измерений с интервалом 2 минуты. Результаты измерений с точностью до 2 мм. рт. ст. использовались для вычисления среднего арифметического. Частоту сердечных сокращений (ЧСС) определяли за 60 секунд.

Антропометрический метод: измерение массы тела проводилось при помощи медицинских рычажных весов в положении обследуемого стоя (точность

измерения до 0,1 кг), измерение роста проводили в положении стоя при помощи ростомера (точность измерения – до 0,5 см). Индекс массы тела (ИМТ) определяли в кг/м². Масса тела считалась нормальной при значениях ИМТ до 24,9 кг/м², избыточной – от 25 до 29,9 кг/м², ожирение регистрировали при значении ИМТ более 30 кг/м².

Забор крови для исследования проводился натошак из локтевой вены вакутейнером. Уровни липидных показателей (ОХС, ТГ, ХС-ЛНП, ХС-ЛВП) определяли энзиматическими методами с использованием стандартных наборов «Bioson» (Германия) на биохимическом анализаторе "Labssystem FP-900" (Финляндия) в лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН (зав. лабораторией д.б.н. Каштанова Е.В.). Биохимические исследования подвергались регулярному внутреннему и внешнему контролю качества. Уровень холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС-ЛНП) рассчитывали по формуле Фридвальда при концентрации ТГ, не превышающей 4,5 ммоль/л: $\text{ХС-ЛНП} = \text{ОХС} - (\text{ХС-ЛВП} + (\text{ТГ}/5))$ мг/дл. Целевые значения: ОХС $\leq 4,0$ (для пациентов с СД 2 или с СД 1 и микроальбуминурией) и $\leq 4,5$ ммоль/л (для пациентов со значительным повышением одного из факторов риска), ТГ $< 1,7$ ммоль/л, ХС-ЛНП $\leq 1,8$ ммоль/л (для пациентов с СД 2 или с СД 1 и микроальбуминурией) $\leq 2,5$ ммоль/л (для пациентов со значительным повышением одного из факторов риска), ХС-ЛВП $> 1,0$ ммоль/л для лиц мужского пола, $> 1,2$ ммоль/л для женского пола.

Индекс атерогенности (ИА) определялся по формуле: $\text{ИА} = (\text{ОХС} - \text{ХС-ЛВП}) / \text{ХС-ЛВП}$.

Уровень глюкозы венозной крови определяли энзиматическими методом с использованием стандартных реактивов «Bioson» (Германия). Референсные значения 3,3-5,5 ммоль/л.

Максимальное значение ОХС – 772 мг/дл (19,97 ммоль/л). Максимальное значение ХС-ЛНП – 466 мг/дл (12,06 ммоль/л).

Средние значения ИМТ составили $27,8 \pm 5,5$. Средний уровень глюкозы составил $5,5 \pm 1,8$ ммоль/л. Процент пациентов с диагнозом СД2 по данным опроса составил – 7%.

У всех обследованных были получены ответы на вопрос о приеме липид-снижающих препаратов. Количество обследованных, принимающих липид-снижающие препараты составило 4,4% ($n=40$) – данные по состоянию на момент проведения скрининга в 2001-2003 гг. Все липид-снижающие препараты относились к группе статинов.

2.1.2 Выборка для прямого автоматического секвенирования промотора и экзонов гена *LDLR*

Для 40 человек выполнено прямое автоматическое секвенирование промотора и экзонов гена *LDLR*: 20 человек с максимально высокими значениями ОХС и 20 человек с низкими значениями ОХС.

Из основной выборки 9360 чел. были отобраны 10 мужчин и 10 женщин в возрасте 45-49 лет с наиболее высоким уровнем общего холестерина сыворотки в данной возрастной группе (от 8,6 ммоль/л до 20,0 ммоль/л). В отличие от общепринятых критериев диагностики СГХС при формировании выборки не принимали в расчет значения уровней триглицеридов и холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности, данные семейного анамнеза и анамнеза заболевания.

Из основной выборки 9360 чел. были отобраны 8 мужчин и 12 женщин в возрасте 45-49 лет с наименьшим уровнем общего холестерина сыворотки в данной возрастной группе (от 2,95 ммоль/л до 4,0 ммоль/л) (таблица 2.1.).

Таблица 2.1 – Характеристика липидного спектра лиц с максимально высокими и низкими значениями ОХС из популяционной группы взрослого населения г. Новосибирска

	М ± SD*	Минимум	Максимум
Группа с высокими значениями ОХС (n=20)			
ОХС, ммоль/л	10,5±3,1	8,6	20,0
ТГ, ммоль/л	3,3±2,5	1,0	10,7
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,5±0,4	0,9	2,0
ХС-ЛНП, ммоль/л	5,65±2,2	2,3	10,9
Глюкоза, ммоль/л	6,3±2,5	4,0	12,0
ИМТ, м²/кг	27,8±6,0	19,0	45,0
Возраст, лет	45,6±1,5	44	49
Группа с низкими значениями ОХС (n=20)			
ОХС, ммоль/л	3,6±0,2	2,95	4,0
ТГ, ммоль/л	1,1±0,2	0,6	1,5
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,3±0,3	0,8	1,8
ХС-ЛНП, ммоль/л	1,3±0,2	0,9	1,7
Глюкоза, ммоль/л	4,8±0,6	4,0	6,0
ИМТ, м²/кг	25,5±5,0	19,0	38,0
Возраст, лет	46,2±1,5	44	48

2.1.3 Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией (СГХС) формировалась в клинко-диагностическом отделении НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН.

В исследование включены 80 пациентов, направленных врачом-липидологом на молекулярно-генетическое исследование, с диагнозом семейная гиперхолестеринемия.

Диагноз СГХС был поставлен с использованием клинических липидных критериев Dutch Lipid Clinic Network Criteria [280]. Согласно критериям, проведена балльная оценка (таблица 2.2) для пациентов с СГХС.

Из 80 человек 34 пациента были с диагнозом «определенная» СГХС (DLCN>8 баллов), 5 пациентов с диагнозом «вероятная» СГХС (DLCN 6-8 баллов) и 41 человек с диагнозом «возможная» СГХС (DLCN 3-5 баллов). Группа пациентов включала 60 пробандов и 20 родственников пробандов. Среди родственников пробандов 70 % (n=14) составляли дети пробандов.

Пациентам проведено клиническое обследование, ультразвуковая диагностика, выполнен забор крови для биохимического (липидный профиль, показатели общей биохимии) и молекулярно-генетического исследования.

Обследование пациентов и их родственников первой линии родства проводилось с использованием принципов каскадного генетического скрининга [198]: на первом этапе проводится скрининг повышенного содержания холестерина, далее у обследованных лиц с гиперхолестеринемией проводится сбор семейного анамнеза и анализ клинических проявлений, в случае диагноза «вероятная» или «определенная» СГХС по клиническим критериям пациенту и его родственникам с гиперхолестеринемией назначается молекулярно-генетическое исследование.

Показания для молекулярно-генетической диагностики СГХС [198]:

- рекомендуется с целью подтверждения диагноза «гомозиготной СГХС» проведение молекулярно-генетического исследования, направленного на выявление патогенных или вероятно патогенных вариантов нуклеотидной последовательности в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*
- рекомендуется с целью подтверждения диагноза «гетерозиготной СГХС» проведение молекулярно-генетического исследования, направленного на

патогенные или вероятно патогенные варианты нуклеотидной последовательности в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, у лиц с суммой баллов 6 и более согласно клиническим критериям DLCN.

Таблица 2.2 – Голландские диагностические критерии СГХС (Dutch Lipid Clinic Network Criteria)

Семейный анамнез <i>Максимальное количество баллов за раздел: 2</i>	Баллы
а) Родственник 1-й степени родства с ранней (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) ИБС или другим сосудистым поражением или Родственник 1-й степени родства с ХС ЛПНП >95-го перцентиля	1
б) Родственник 1-й степени родства с ксантомами сухожилий и/или дугой роговицы или Дети в возрасте до 18 лет с ХС ЛПНП >95-го перцентиля	2
История заболевания <i>Максимальное количество баллов за раздел: 2</i>	
а) У пациента ранняя (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) ИБС	2
б) У пациента раннее (мужчины <55 лет, женщины <60 лет) развитие атеросклеротического поражения церебральных/периферических сосудов	1
Физикальное обследование <i>Максимальное количество баллов за раздел: 6</i>	
а) Ксантомы сухожилий	6
б) Липидная дуга роговицы в возрасте моложе 45 лет	4
Лабораторный анализ (при нормальных значениях ХС ЛВП и триглицеридах) <i>Максимальное количество баллов за раздел: 8</i>	
а) ХС ЛНП >8,5 ммоль/л	8
б) ХС ЛНП 6,5-8,5 ммоль/л	5
в) ХС ЛНП 5-6,4 ммоль/л	3
г) ХС ЛНП 4-4,9 ммоль/л	1
Анализ ДНК <i>Максимальное количество баллов за раздел: 8</i>	
Имеется функциональная мутация гена <i>LDLR</i> , <i>APOB</i> , <i>PCSK9</i>	8
Диагноз СГХ	
Определённая	>8 баллов
Вероятная	6-8 баллов
Возможная	3-5 баллов

Пробы крови для биохимических исследований забирали однократно из локтевой вены утром натощак через 12 ч после приема пищи. Уровни липидных

показателей (ОХС, ТГ, ХС-ЛНП, ХС-ЛВП) и глюкозы в крови представлены в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Данные биохимического обследования пациентов старше 18 лет с СГХС

	М ± SD*	Минимум	Максимум
Глюкоза, ммоль/л	5,7±1,2	4,0	10,4
ОХС, ммоль/л	8,6±3,4	3,4	25,0
ТГ, ммоль/л	1,8±1,4	0,4	8,5
ХС-ЛВП, ммоль/л	1,4±0,4	0,54	2,2
ХС-ЛНП, ммоль/л	5,6±2,3	1,11	11,94
ИМТ, м²/кг	27,2±4,6	19,0	39,0
Возраст, лет	46,0±13,9	20	73

* М ± SD – среднее ± стандартное отклонение

Уровни липидных показателей (ОХС, ТГ, ХС-ЛНП, ХС-ЛВП) и глюкозы определяли энзиматическими методами на автоматическом биохимическом анализаторе KoneLab300i (Финляндия) с использованием реактивов TermoFisher (Финляндия). ХС-ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда, при ХС-ЛНП более 4,5 ммоль/л использовался метод прямого определения ХС-ЛНП.

У пациентов с семейной гиперхолестеринемией средние значения ОХС составили 8,6±3,4 ммоль/л, максимальный уровень 25 ммоль/л. Относительно невысокий уровень ОХС обусловлен тем, что на момент первичного осмотра врачом-липидологом клинко-диагностического центра препараты, снижающие уровень липидов, принимали 41 % пробандов. Все липид снижающие препараты относились к группе статинов. У одного пробанда была непереносимость липид снижающих препаратов группы статинов. По данным осмотра – у 42% обследованных с СГ определяются ксантомы сухожилий. У трех пробандов (4,9 %) был сопутствующий диагноз СД2.

2.1.4 Выборка лиц с коронарным атеросклерозом

Образцы атеросклеротических бляшек и венозной крови были получены от пациентов ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства Здравоохранения РФ. Исследование проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН (научный руководитель работы – д.м.н., член-корр. РАН Рагино Ю.И.) и ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России (научный руководитель работы – д.м.н., проф. Чернявский А.М.). До включения в исследование у всех участников было получено письменное информированное согласие.

В исследование были включены 30 мужчин 40-70 лет, средний возраст $53,0 \pm 3,8$, с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без ОКС со стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК. Пациенты поступали в клинику ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России на операцию коронарного шунтирования, в ходе операции по интраоперационным показаниям была проведена эндартерэктомия из коронарной(-ых) артерии(-й). От каждого пациента были получены по 3 образца материала эндартерэктомии, содержащего атеросклеротические бляшки. Каждый образец был поперечно и продольно разделен на 4 фрагмента, содержащие части атеросклеротических бляшек, для проведения гистологических исследований, биохимических и молекулярно-генетических исследований.

Критериями исключения пациентов из исследования были ИМ давностью менее 6 месяцев, острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания.

Длительность ИБС была от 1 до 20 лет. При оценке наличия факторов риска ИБС у 85% была артериальная гипертензия, у 22% мужчин – сахарный диабет 2 типа. Средние значения индекса массы тела у обследованных пациентов был

30,5±2,2 кг/м². Курили 45%. Все пациенты получали липид-снижающую терапию препаратами группы статинов.

2.2 Гистологическое исследование фрагментов атеросклеротических бляшек

Гистологическое исследование фрагментов атеросклеротических бляшек всех образцов из группы пациентов с коронарным атеросклерозом выполнено в патоморфологической лаборатории ФГБУ НМИЦ им. ак. Е.Н. Мешалкина Минздрава России (рук. лаборатории д.м.н. проф. Волков А.М.).

После макроскопического описания образцов, включающего описание степени распространенности бляшки, уровня стенозирования просвета артерии, наличия кровоизлияния в структуры бляшки, участков обызвествления, тромбов и окрашивания образцов гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона, проводился гистологический анализ фрагментов интимы/медии коронарных артерий на бинокулярном микроскопе с цифровым фотовыходом Axiostar Plus (C. Zeiss, Германия).

В ходе гистологического анализа определяли разные стадии формирования бляшки, с подробным описанием состояния покрышки бляшки, её эндотелиальной поверхности, ядра бляшки, периферии бляшки/очага, клеточно-элементного состава всех компонентов атеросклеротического очага (таблица 2.4).

Таблица 2.4 – Описание бляшек для исследования РНК

Стабильные	Нестабильные
Фиброзный тип	Некротически-дистрофический тип
Гистологическое исследование	
Коллагеновые волокна, эластичные волокна, кальций; без клеточной активности	Пенистые клетки, мононуклеары, холестерин; утолщение интимы, признаки воспаления и некроза

Нестабильная атеросклеротическая бляшка определялась как повреждённая бляшка с толщиной фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрированная макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения диаметром 0,3 мм), с крупным липидным ядром (>40%).

Был определен тип нестабильных бляшек [281]:

- 1) липидный тип – фиброатерома с тонкой фиброзной покрышкой (рисунок 2.2);
- 2) воспалительно-эрозивный тип – бляшка с повышенным содержанием протеогликанов или воспалением, приводящим к эрозии и тромбозу (рисунок 2.3);
- 3) дистрофически-некротический тип – бляшка с кальцинированным ядром (рисунок 2.4).

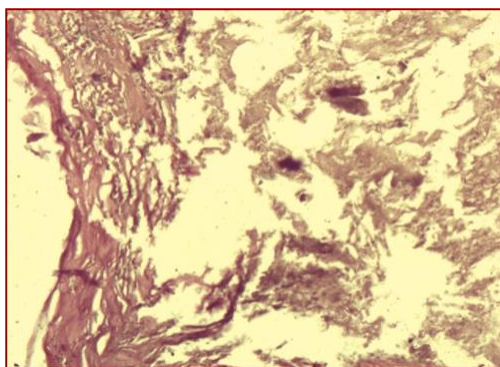


Рисунок 2.2 – Нестабильная атеросклеротическая бляшка. Фиброатерома, истончения и надрывы покрышки. Окраска гематоксилин-эозин и Ван-Гизон, х 240

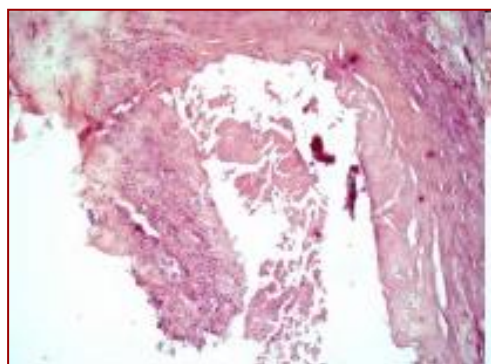


Рисунок 2.3 – Эрозия нестабильной атеросклеротической бляшки воспалительного типа. Окраска гематоксилин-эозин, х 240

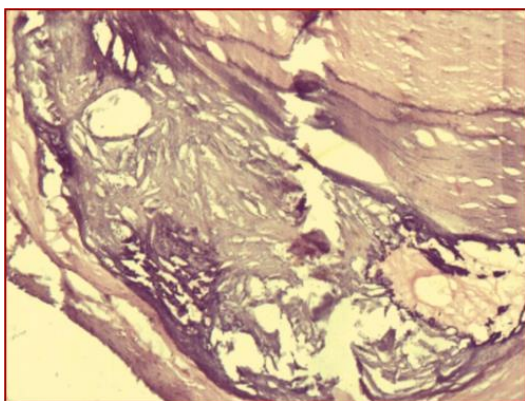


Рисунок 2.4 – Нестабильная атеросклеротическая бляшка. Дистрофически-некротический тип. Кальциноз, дистрофия, очаги некроза, надрыв покрышки бляшки. Окраска гематоксилин-эозин и Ван Гизон, х 240

2.3 Исследование субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности

Проведено исследование субфракционного профиля липопротеинов низкой плотности для 180 человек из популяционной группы (группа с высоким ОХС, n=60; группа с нормальным и низким ОХС, n=60; выборка из популяционной группы, n=60) методом электрофореза в градиенте 2-16% полиакриламидного геля (Austin M.A., 1991) на аппарате «SE 600 Ruby Standard Dual Cooled Vertical» (GE Healthcare, Австрия) 24 часа при 4°C и последующей окраски геля Coomassie blue R. Денситометрия гелей осуществлялась с использованием трансиллюминаторной системы «Geldoc» (BioRad, США). В качестве стандарта использовали набор белковых калибраторов «Amersham» (тиреоглобулин 170 Å, ферритин 122 Å, каталаза 104 Å, ЛДГ 81 Å, БСА 71 Å).

2.4. Молекулярно-генетические методы исследования

В работе использованы следующие молекулярно-генетические методы:

- выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови,
- выделение РНК из атеросклеротических бляшек,

- генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов, с использованием ПДРФ-анализа и ПЦР в реальном времени,
- прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру,
- таргетное высокопроизводительное секвенирование,
- методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA),
- полногеномное секвенирование ДНК,
- полноэкзомное секвенирование ДНК,
- полногеномное секвенирование РНК.

Изучение частоты ряда распространенных однонуклеотидных вариантов в генах липидного обмена и ассоциативные исследования с биохимическими показателями выполнено на материале популяционной группы. Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов ассоциированных с развитием СГХС и генов липидного обмена выполнено для группы пациентов с клиническим диагнозом СГХС. Полноэкзомное секвенирование образцов ДНК и полногеномное секвенирование образцов РНК с анализом генов липидного обмена проведено в группе пациентов с коронарным атеросклерозом.

2.4.1 Выделение ДНК и РНК

Выделение ДНК

Для всех, включенных в исследование, групп выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось с использованием метода фенол-хлороформной экстракции [282] в Отделе молекулярной генетики человека ИЦиГ СО РАН – зав. отделом академик РАН, профессор, д.м.н. Воевода М.И.

К образцу крови 10 мл добавляли 5 объемов буфера А (10 mM трис-HCl, pH=7.5; 10 mM NaCl; 3 mM MgCl₂) и проводили гемодиализ, растирая сгустки в гомогенизаторе Поттера. Осадки, полученные центрифугированием при 2500 g, промывали дважды буфером А и ресуспендировали в 0,5 мл буфера В (10 mM ЭДТА; 100 mM NaCl; 50 mM трис-HCl, pH=8.5). После добавления SDS до 0,5% и протеиназы К до 200 мкг/мл смесь инкубировали в течение 12 часов при 37°C.

Депротеинизацию проводили последовательно водонасыщенным фенолом, смесью фенол-хлороформ (1:1) и хлороформом. После отделения водной фазы от органической ДНК осаждали, добавляя до 1/5 от объема полученной фазы раствора 5М NaCl и равный объем изопропилового спирта. Инкубировали смесь при -20°C 2 часа. Центрифугировали полученную смесь 15 минут 13400 об/мин. Осадок, полученный центрифугированием на микроцентрифуге «Eppendorf» в течение 10 минут 13400 об/мин, дважды промывали 80% этанолом. Полученный осадок сушили в термостате на 56°C 20-25 минут. ДНК разводили деионизированной водой до концентрации 1,0 мкг/мкл.

Образцы представляли высокомолекулярную ДНК. Величина фрагментов ДНК > 1500 пар оснований. Полученную ДНК хранили при -20°C в замороженном виде.

Выделение РНК

Для предотвращения деградации РНК, фрагменты ткани атеросклеротических бляшек, предназначенные для генетического исследования, незамедлительно помещались в стабилизирующий раствор RNeasy (QIAGEN, Германия) и замораживались для последующей транспортировки. Выделение РНК из образцов проводили при помощи набора РНК Бест экстракция 100 (АО Вектор Бест, Новосибирск, Россия).

Для детекции выделенной РНК выполнялась реакция обратной транскрипции кДНК с последующей постановкой ПЦР на кДНК гена альфа актина. Подтверждение наличия РНК, качество и количество полученных проб тотальной РНК проверялось методом УФ-спектроскопии на приборе «Epoch» (BioTek, США).

Перед приготовлением библиотек, примеси геномной ДНК удалялись с использованием набора DNA free kit (Ambion, США).

Качество извлеченной РНК контролировалось с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США).

2.4.2 Генотипирование однонуклеотидных полиморфизмов генов липидного обмена

На первом этапе исследования в популяционной группе была изучена частота аллелей и генотипов вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* (таблица 2.5).

Таблица 2.5 – Методы генотипирования полиморфизмов изученных генов

Номер варианта в референсной последовательности	Название гена	Количество обследованных	Метод генотипирования	Рестриктаза/ TaqMan
rs2230806	<i>ABCA1</i>	272	ПДРФ-анализ	BstENI
rs2066718	<i>ABCA1</i>	272	ПДРФ-анализ	BstBAI
rs670	<i>APOA1</i>	287	ПДРФ-анализ	Msp I
rs5742904	<i>APOB</i>	366	ПЦР в реальном времени	TaqMan SNP Genotyping Assay
rs1042023	<i>APOB</i>	293	ПДРФ-анализ	HaeIII
rs5128	<i>APOC3</i>	286	ПДРФ-анализ	Psp 124BI
rs429358 rs7412	<i>APOE</i>	894 894	ПДРФ-анализ	ASpLE1
rs708272	<i>CETP</i>	870	ПДРФ-анализ	Taq I
rs2766597	<i>CLPS</i>	265	ПЦР в реальном времени	TaqMan SNP Genotyping Assay
rs320	<i>LPL</i>	727	ПДРФ-анализ	Hind III
rs5888	<i>SCARB1</i>	853	ПДРФ-анализ	HinfI
rs2228314	<i>SREBF2</i>	278	ПДРФ-анализ	Msp I

Генотипирование однонуклеотидных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* выполнено по стандартным методикам (таблица 2.5).

Анализ ассоциации с рядом биохимических показателей крови, включая данные липидного профиля, выполнен для однонуклеотидных вариантов генов *APOE*, *CETP*, *LPL* и *SCARB1*.

2.4.3 Прямое автоматическое секвенирование гена *LDLR*

Прямое автоматическое секвенирование промотора и экзонов гена *LDLR* выполнено для каждого пациента на автоматическом секвенаторе ABI 3500 (USA). Анализ хроматограмм, полученных при секвенировании, проводился с использованием программ Chromas и DNASTar (MegAlign). Для секвенирующей ПЦР области каждого экзона гена *LDLR*, использовали праймеры, представленные в таблице 2.6.

Таблица 2.6 – Праймеры для секвенирования промотора и экзонов гена *LDLR*

Номер экзона	Прямой	Обратный	Длина продукта (п.н.)
Prom	tcctaaggggagaaatcaatatttacgt	caaatgtcttcacctcactgcaaga	613
Exon 1	ctcttgacgtgaggtgaagac	ggctccctctcaacctattc	296
Exon 2	ttgagagaccctttctcctttcc	gcatatcatgcccaaagggg	183
Exon 3	ttccttgagtgacagttcaatcc	gataggctcaatagcaaaggcagg	196
Exon 4	cggctatagaatgggctgggtgtg	tgtgttggaatccacttcggca	562
Exon 5	tgggattccaggcatgag	gccctctggcttcacaaat	305
Exon 6	acgaaactgaggctcagacacacc	gctccccacaaactctgcaagc	222
Exon 7	ggcgaagggatgggtagggg	gttgccatgtcaggaagcgc	236
Exon 8	aggctgggctgtctcctggctgc	aaactccccaccactgtgcctg	310
Exon 9	tcagccgcaccctgcaggatga	catcagcgccaggagccctcatct	336
Exon 10	ttggcccgagggtgagatgagg	agccctcagcgctcgtggata	313
Exon 11	tttcttcagaattcgtgcacgca	gtctccagcctgtgcccg	254
Exon 12	ccagggtgctttctgctaggtc	gcgttcattctggcttgagtg	334
Exon 13	agttgtggagagagggtggcctgtg	cagggcaggaacgagatcatcagct	333
Exon 14	cttcacaacctcaccagcca	gcagagagaggctcaggagg	381
Exon 15	cttggcctcccaagggtcatttgaga	tggtcgtggccactgaagggacc	340
Exon 16	accaccgtcctctgcctgctccat	caggcacgaggtcacatagcgggag	221
Exon 17	gcccgtgtttcactccagccac	cggcctgttccttgaggatcatat	321
Exon 18	ctgccaggcccagaagggtgaga	cccgttggtgccatctgctgt	509

Поиск вариантов проводился с использованием базы данных GeneCard (<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/>).

2.4.4 Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов липидного обмена

Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов липидного обмена выполнено на клинической выборке пациентов с СГХС (n=80).

Таргетная панель генов была разработана автором и включала кодирующие области и прилегающие сайты сплайсинга 43 генов: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *CETP*, *LPL*, *HMGCR*, *NPC1L1*, *PPARA*, *MTTP*, *LMF1*, *SAR1B*, *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5*, *APOA1*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE*, *LCAT*, *ANGPTL3*, *LIPC*, *APOA4*, *APOC3*, *SREBF1*, *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *POLD1*, *LPA*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, *SMAD9*, *LIPG*. 3 гена были ассоциированы с аутосомно-доминантной формой СГХС - *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*; гены *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1* ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой СГХС; гены *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5* ассоциированы с вариациями фенотипа СГХС, включая развитие гипертриглицеридемии; редкие варианты в генах аполипопротеинов могут быть ассоциированы с СГХС.

Таргетное высокопроизводительное секвенирование (NGS) проведено с использованием зондов со строгой специфичностью (NimbleGen SeqCap Target Enrichment, Roche) на секвенаторе MySeq (Illumina, USA). Покрытие составило 97%.

Использована стандартная высокомолекулярная ДНК в количестве 1 мкг для каждого пациента, ОП260/280 не менее 1,8. Таргетный отбор генов проведен с использованием NimbleGen Sequence Capture (SeqCap EZ Library), библиотеки олигонуклеотидных зондов, комплиментарных областям кодирующих и не кодирующих последовательностей генов *APOB*, *LDLR*, *PCSK9*, *LDLRAP1* и др. Синтезированы зонды со строгой специфичностью панели NimbleGen. Анализ данных секвенирования включает картирование данных на геном человека версии

GRCh38. Для верификации мутаций, выявленных методом высокотехнологичного секвенирования, использовалось прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру.

Проведена очистка образцов. Выполнена фрагментация ДНК. Лигирование адаптеров с последующим удалением мелких фрагментов частицами AMPure. Проведена оценка качества библиотеки и количественный анализ. Подготовлены аликвоты для работы. Проведена процедура отбора таргетных областей генома с использованием библиотеки зондов, включающая следующие этапы: амплификация исходной shotgun библиотеки ДНК в процессе Ligation Mediated PCR, гибридизация библиотеки ДНК с библиотекой SeqCap EZ, промывка и восстановление гибридизованной ДНК, амплификация гибридизованной ДНК в процессе ПЦР, вторая гибридизация библиотеки ДНК с библиотекой SeqCap EZ, промывка и восстановление гибридизованной ДНК, амплификация гибридизованной ДНК в процессе ПЦР, постановка секвенирования с реагентами GS Junior Titanium Series. Обработка данных секвенирования.

Приготовленные образцы ДНК секвенировали на платформе Illumina MiSeq (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США).

Редкие «вероятно патогенные» и «патогенные» варианты были верифицированы прямым автоматическим секвенированием по Сэнгеру (таблица 2.6).

2.4.5 MLPA анализ у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Для пациентов с СГХС, которым было выполнено таргетное секвенирование генов липидного обмена и не выявлены функционально–значимые замены в генах *LDLR*, *APOB* и *PCSK9* проведен анализ методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA) для определения структурных изменений (делеции, дупликации) промотора и экзонов гена *LDLR*. MLPA анализ проведен с использованием коммерческого набора SALSA MLPA KIT P062 (MRCHolland, Amsterdam) с последующим разделением флуоресцентно меченных фрагментов

методом капиллярного электрофореза (секвенатор ABI3500). При интерпретации результатов MLPA анализа использовано программное обеспечение Coffalyser.Net (MRCHolland, Amsterdam).

2.4.6 Полногеномное секвенирование ДНК в группе пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии

На основании выборки семейной гиперхолестеринемии, сформированной по критериям DLCN и включающей случаи заболевания, подтвержденные молекулярно-генетическим анализом, построены решающие деревья, которые позволили выделить из выборки случаи, требующие дополнительного молекулярно-генетического анализа. Разработана программа на языке Python 3.9, предназначенная для построения ансамбля решающих правил для прогнозирования СГХС на основе машинного обучения в условиях ограниченной обучающей выборки. Решающие правила сохранялись в виде представления данных языка разметки для прогнозного моделирования (Predictive Model Markup Language). [283-285].

Пять пробандов с наиболее тяжелым клиническим проявлением фенотипа СГХС без патогенных вариантов в изученных методами секвенирования и MLPA генах были отобраны для выполнения полногеномного секвенирования на платформе HiSeq 1500 (Illumina).

Автоматизированную обработку и аннотирование полученных данных секвенирования проводили на платформе NGS Wizard [286]. Потенциальный эффект влияния новых миссенс-вариантов на функцию/структуру белка оценивали с помощью данных инструментов прогнозирования: CADD [287], PolyPhen2 [288], и MutationTaster [289], а также данных о частоте этих вариантов в популяциях, согласно данным базы gnomAD [290]. Патогенность новых вариантов оценивали в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии (ACMG) [291]. Анализ сетей белок-белковых взаимодействий выполняли в STRING [292].

2.4.7 Полноэкзомное секвенирование ДНК в группе пациентов с коронарным атеросклерозом

Качество анализируемой ДНК было оценено с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., USA).

Обогащение и подготовка библиотек для полноэкзомного секвенирования выполнялась с использованием набора SureSelectXT Human All Exon V6 +UTR (Agilent Technologies Inc., USA). Анализ готовой библиотеки был выполнен на платформе Illumina Nextseq 500 (Illumina, Calif., USA). Анализ данных секвенирования включал картирование данных на геном человека версии GRCh38 с помощью программы Burrow–Wheeler Alignment tool (BWA v.0.7.17) [293]. Покрытие при экзомном секвенировании составляло не менее 50 прочтений с качеством $Q > 70 > 100$. С помощью пакета Picard произведён поиск ПЦР-дубликатов чтений с целью их исключения из дальнейшего анализа. Поиск полиморфизмов проведён в пакете GATK с использованием процедуры локального перекартирования коротких инсерций/делеций и рекалибровки качества чтений. Возможные функциональные эффекты вариантов оценивались в базе данных dbNSFP [294], объединяя данные из инструментов прогнозирования *in silico*: SIFT [295], Polyphen2 v2.2.5 [288], MutationTaster [289], PROVEAN [296] и другие.

После биоинформационной обработки проведен поиск вариантов. Интерпретация данных, полученных методом секвенирования проведена в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики [291].

Проведен анализ данных выявленных вариантов в исследуемых генах с использованием ресурсов PubMed [297], HGMD [135, 298], ClinVar [299], LOVD [300]; оценка частоты встречаемости в базах данных – 1000 Genomes [301] и gnomAD [290].

2.4.8 Полногеномное секвенирование РНК в группе пациентов с коронарным атеросклерозом

После проведения гистологического исследования и определения типов атеросклеротических бляшек было выполнено полногеномное секвенирование РНК для двух образцов атеросклеротических бляшек в двух технических повторах:

- стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа;
- нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа.

Пациенты для включения в исследование транскриптома были выбраны по следующим критериям: оба пациента мужского пола, близкого возраста (61 год и 64 года); с диагнозом ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения III функциональный класс, постинфарктный кардиосклероз, хроническая сердечная недостаточность IIА ст., функциональный класс III (NYHA); без сахарного диабета; не курят, не злоупотребляют алкоголем.

Во всех трех образцах атеросклеротических бляшек, полученных от каждого пациента, тип бляшек был однороден для каждого из пациентов по результатам гистологического исследования.

Подготовка библиотек для секвенирования проводилась с использованием набора Illumina's TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina, США). Количественный анализ библиотек выполнялся на флуориметре Qubit® 2.0 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США), качество библиотек контролировалось с использованием системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США).

Полногеномный профиль экспрессии в тканях бляшек определялся с помощью высокопроизводительного секвенирования на приборе HiSeq 2000 (Illumina, США).

Анализ данных секвенирования включал картирование данных на геном человека версии GRCh38 с помощью программы BWA 0.7.12 [293], расчет RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) для всех генов, присутствующих в

аннотации используемой версии генома человека. Для выявления транскриптов генов со статистически значимыми различиями в экспрессии между типами бляшек, использовали следующие параметры: $FDR < 0.05$, более чем 8-кратные различия ($-3 < \log_2 \text{fold_change} < +3$), экспрессия одного и того же гена в одном из типов бляшек на уровне более 50 RPKM.

2.5 Статистический анализ

Статистическую обработку результатов проводили в пакете прикладных статистических программ SPSS Software (Version 22.0, SPSS inc., Chicago, Illinois) [302]. Интерпретация полученных значений статистических критериев оценки значимости различий распространенности аллелей и генотипов между популяциями выполнена с использованием критерия χ -квадрат с поправкой Йейтса, критерия χ -квадрата с поправкой на правдоподобие, точного критерия Фишера (двусторонний). Тест на соблюдение равновесия Харди-Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 . Для категориальных переменных представлены абсолютные и относительные частоты.

В ассоциативных исследованиях оценку различий средних значений количественных показателей между разными генотипами проводили с помощью одномерного дисперсионного анализа с использованием общей линейной модели (GLM) в пакете прикладных статистических программ SPSS Software. Была проведена проверка на нормальность распределения с помощью гистограмм и критерия Колмогорова-Смирнова. Модель дисперсионного анализа включает анализ отдельных взаимодействий факторов влияния (фиксированная переменная – генотипы варианта изучаемого гена) и взаимодействия с ковариациями (пол, возраст и индекс массы тела). Для формирования сумм квадратов для метода наименьших квадратов использован подход III типа. Выведены средние значения и стандартная ошибка для совокупной выборки для всех слоев изучаемого фактора. Дескриптивные статистики: среднее значение, стандартные отклонения и количество наблюдений во всех ячейках для непрерывных показателей. Проведен

тест на однородность дисперсии, дополнительный тест попарных сравнений, влияние ковариаций. Критерием статистической значимости фактора был уровень $p \leq 0,01$ [304].

В анализе субфракционного профиля частиц ЛНП была проведена проверка на нормальность распределения методом Шапиро-Уилка, критерием статистической значимости рангового коэффициента корреляции по Спирмену был уровень $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Распространенность аллелей и генотипов однонуклеотидных вариантов в генах, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии, в популяционной группе Западной Сибири

Выполнен анализ распространенности аллелей однонуклеотидных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* в популяционной группе Западной Сибири (таблица 3.1). В исследование включены как редкие варианты, с частотой редкого аллеля (MAF) < 1 %, так и распространенные, с частотой более редкого аллеля до 45 %.

Таблица 3.1 – Частота аллелей однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии

Ген	Номер варианта в референсной последовательности	HGMD	Частота редкого аллеля в европеоидной популяции Западной Сибири, % (n)	MAF по данным базы GnomAD для European (non-Finnish), %
<i>ABCA1</i>	rs2230806	CM030397	26,1 (272)	27,4
<i>ABCA1</i>	rs2066718	CM042911	12,4 (271)	8,6
<i>APOA1</i>	rs670	CR900263	27,4 (287)	17,3
<i>APOB</i>	rs5742904	CM890006, CM055087	0,7 (366)	0,6
<i>APOB</i>	rs1042023	CM980095	1,7 (293)	1,1
<i>APOC3</i>	rs5128	CR041556	10,5 (286)	9,1
<i>APOE</i>	ε2, ε3, ε4 (rs429358 и rs7412)	CM900020 CM860003	ε2 – 9,0 ε4 – 11,0 (894)	10,0 14,0
<i>CETP</i>	rs708272	CM030397	46,8 (870)	43,5
<i>CLPS</i>	rs2766597	нд	0,4 (265)	1,4
<i>LPL</i>	rs320	CS931395	26,8 (727)	27,4
<i>SCARB1</i>	rs5888	CM994636	43,3 (853)	41,2
<i>SREBF2</i>	rs2228314	CM025969	29,5 (278)	25,5

MAF (minor allele frequency) – частота реже встречающего аллеля

Интерпретация полученных значений статистических критериев оценки значимости различий распространенности аллелей и генотипов между популяциями выполнена с использованием критерия χ -квадрат с поправкой Йейтса, критерия χ -квадрата с поправкой на правдоподобие, точного критерия Фишера (двусторонний) – во всех случаях уровень значимости составил $p > 0,05$.

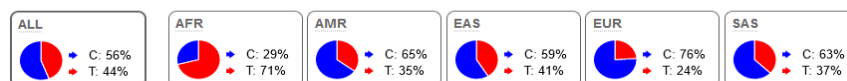
Детальная характеристика variability генома для различных этнических групп позволит изучить фенотипические эффекты аллельных вариантов генов. Следовательно, каждая конкретная популяция должна быть обследована, как по характеру полиморфизма генов предрасположенности к мультифакториальным заболеваниям и в частности, нарушениям липидного обмена, так и по особенностям их фенотипического проявления. Решение этих задач является особо важным для населения России, учитывая многообразие ее этнического состава.

Особенности распространенности редких аллелей ряда однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена, в разных популяциях и этнических группах обуславливает актуальность изучения этого вопроса для популяций, проживающих в разных климатогеографических условиях, в том числе, для жителей Западной Сибири [5, 6, 107, 116-118]. Распределение частоты аллелей в различных этнических группах сформировано, по-видимому, механизмами адаптации к условиям внешней среды.

В сравнении с популяционными группами Западной и Восточной Европы – European (non-Finnish) – распространенность реже встречающихся аллелей изученных однонуклеотидных вариантов генов rs2230806 и rs2066718 (*ABCA1*), rs670 (*APOA1*), rs5742904 и rs1042023 (*APOB*), rs5128 (*APOC3*), rs429358 и rs7412 (*APOE*), rs708272 (*CETP*), rs2766597 (*CLPS*), rs320 (*LPL*), rs5888 (*SCARB1*) и rs2228314 (*SREBF2*) в европеоидной популяционной группе 45-64 лет Западной Сибири статистически значимо не отличается (рисунок 3.1).

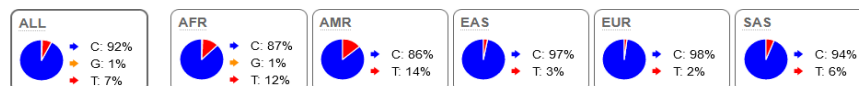
rs2230806

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



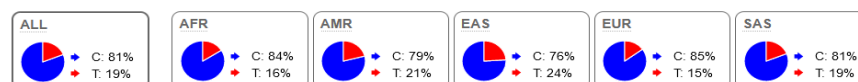
rs2066718

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



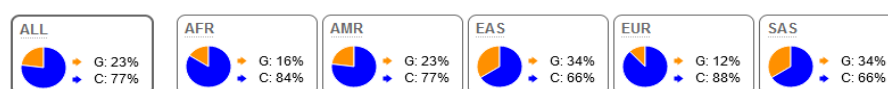
rs670

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



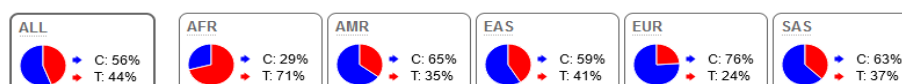
rs5128

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



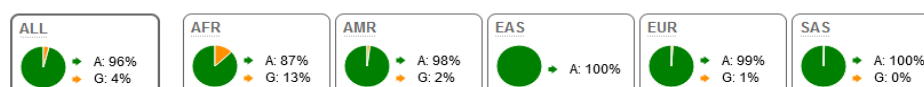
rs708272

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



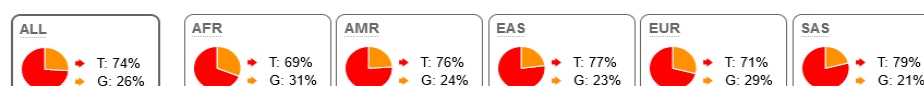
rs2766597

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



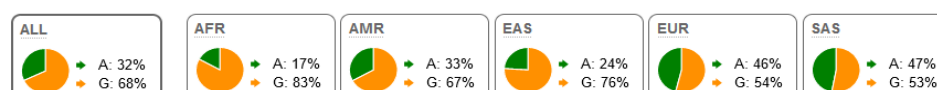
rs320

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs5888

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies



rs2228314

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies

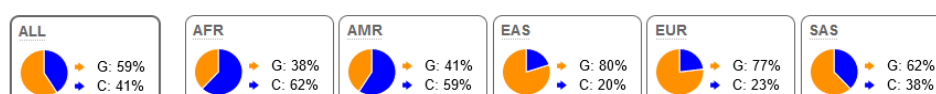


Рисунок 3.1 – Частота распространения вариантов в популяционных группах по данным 1000 Genome Project [301]

Для редких аллелей вариантов rs5742904 R3527Q (по версии GRCh37.p13 chr 2 – R3500Q); rs1042023 Q3432E (по версии GRCh37.p13 chr 2 – Q3405E) гена *APOB*, ассоциированных с развитием семейной гиперхолестеринемии, низкая частота распространения в европеоидной популяционной группе Западной Сибири соответствует данным, полученным для большинства европеоидных популяций, и составляет менее 0,7-1,7% (рисунок 3.2).

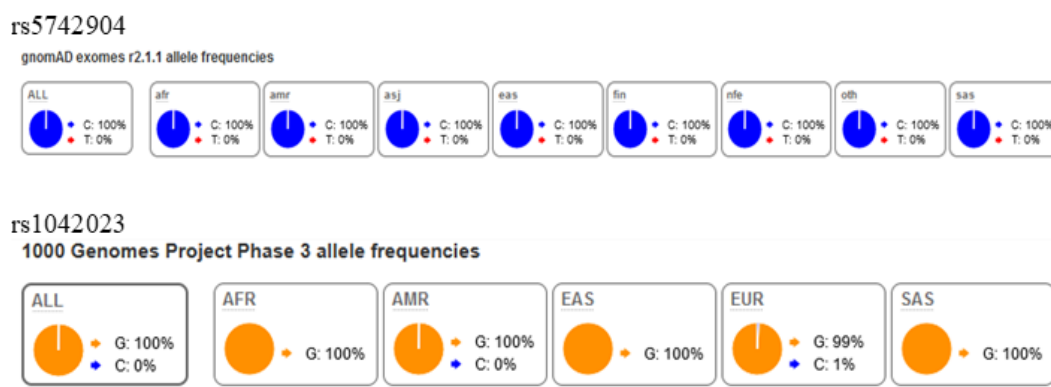


Рисунок 3.2 – Частота распространения в популяционных группах редких аллелей rs5742904 и rs1042023 гена *APOB* [301]

В данной работе проведен анализ полиморфизма кодирующей части гена *APOE* в позиции 3937C/T и 4075C/T. Замена азотистых оснований в ДНК определяет изменение в структуре аминокислотной последовательности белка и приводит к синтезу белка с аминокислотами цистеин или аргинин в положении 112 и 158, при этом формируются наиболее распространенные аллельные варианты: $\epsilon 2$ (Cys112, Cys158), $\epsilon 3$ (Cys112, Arg158) и $\epsilon 4$ (Arg112, Arg158), и формируемые ими генотипы: три гомозиготных ($\epsilon 4/\epsilon 4$, $\epsilon 3/\epsilon 3$, $\epsilon 2/\epsilon 2$) и три гетерозиготных ($\epsilon 3/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 4$, $\epsilon 2/\epsilon 3$). Частота аллелей полиморфизма кодирующей части гена *APOE* различается в популяциях мира (рисунок 3.3). В популяции *Homo sapiens* наиболее распространен аллель $\epsilon 3$, его частота составляет от 0,60 до 0,88 [107]. Частота аллеля $\epsilon 2$ подвержена значительным колебаниям, он практически не встречается у аборигенов Чукотки и Аляски [304], его относительная частота мала в популяциях Японии (0,02), коренных народов Северной Азии (0,03) и максимальна во Франции

(0,14), некоторых популяциях Африки (0,09) и Новой Гвинее (0,142). Аллель $\epsilon 4$ также обладает вариабельной частотой, он редко встречается в популяции Китая (0,06), но часто в популяциях коренных жителей Северной Европы (0,23).

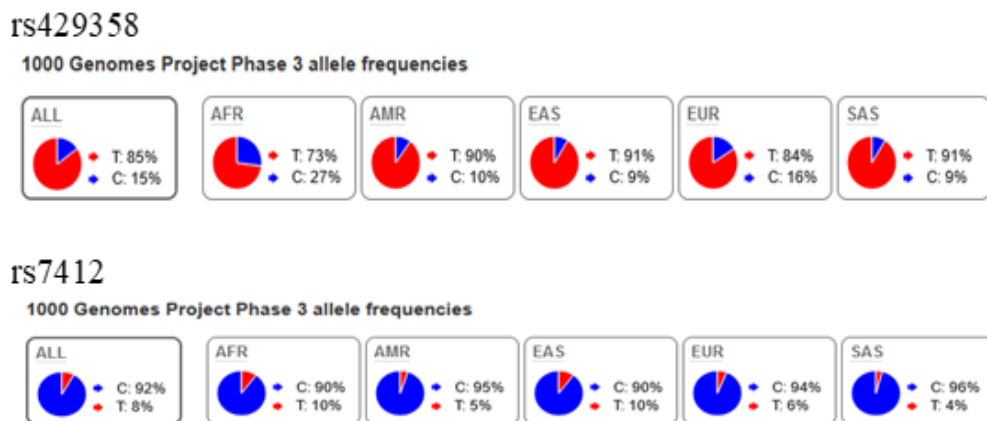


Рисунок 3.3 – Частота распространения в популяционных группах rs429358 и rs7412 гена *APOE* [301]

В европеоидной популяции Западной Сибири наиболее распространенным является аллель $\epsilon 3$. Результаты коррелируют с данными о распространенности аллеля $\epsilon 3$ в мире [305-307]. Частота аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 4$ сопоставима с частотой распространения в европеоидных популяциях Восточной и Западной Европы [308, 309].

По данным научных исследований, в масштабе планеты можно выделить U-образный широтный географический градиент частоты аллеля $\epsilon 4$ с максимальными значениями на экваторе и в циркумполярных областях северного полушария. Следует подчеркнуть то обстоятельство, что наименьшая распространенность аллеля $\epsilon 4$ в популяциях географически совпадают с первичными центрами земледелия на планете. Выделяются три таких независимых очага: в Юго-Западной Азии (7-8 тысячелетия до н.э.), на территории Северного и Центрального Китая (5-4 тысячелетия до н.э.) и в Мезоамерике (7-6 тысячелетия до н.э.) [304]. И наоборот, самая высокая распространенность аллеля $\epsilon 4$ отмечаются в этнических группах,

сохранявших до последнего времени (последнее тысячелетие и даже последние столетия) уклад жизни охотников-собирателей. Этот уклад предшествовал появлению культур сельскохозяйственного типа и являлся единственной формой хозяйственной деятельности человека во всех популяциях планеты примерно 10-12 тысяч лет назад. Наблюдаемое распределение варианта $\epsilon 4$ в этнических группах современного человечества, по-видимому, обусловлено их существованием и типом хозяйственной деятельности в неолитический период. В предшествовавший же палеолитический период наиболее вероятно, что в популяции человека существовал однородное распространение варианта *APOE* с относительно высокой частотой аллеля $\epsilon 4$. Впоследствии произошло снижение его частоты в популяциях первичных центров развития сельскохозяйственного земледелия [74].

Выполнен анализ распространенности генотипов однонуклеотидных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии, в популяционной группе Западной Сибири (таблица 3.2).

В сравнении с популяционными группами Центральной и Восточной Европы – European (non-Finnish) – распространенность генотипов изученных однонуклеотидных вариантов в европеоидной популяционной группе Западной Сибири статистически значимо не отличается.

Выполнен анализ возрастной динамики частоты генотипов для генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*. Обследованные лица были разделены по возрасту на две группы: до 55 лет и 55 лет и старше. Для всех изученных вариантов не получены статистически значимые изменения распространенности генотипов с возрастом ($p > 0.05$).

Анализ популяционной и этнической специфичности вариабельности ДНК позволяет изучить закономерности и особенности развития патологических процессов для популяций, проживающих в существенно различающихся условиях. При отсутствии статистически значимых отличий распространённости изученных вариантов в европеоидной популяции Западной Сибири в сравнении с европеоидными популяциями Центральной и Восточной Европы сохраняются

различия с популяциями Северной и Южной Европы, с популяциями коренных народов Севера и Юга Сибири [74].

Таблица 3.2 – Частота генотипов однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии

Ген	Номер варианта в последовательности	Частота генотипов в европеоидной популяции Западной Сибири, % (n)						Равновесие Харди-Вайнберга
ABCA1	rs2230806	51,5 (140)		44,8 (122)		3,7 (10)		$\chi^2=2,501$; p=0,19
ABCA1	rs2066718	77,5 (210)		20,3 (55)		2,2 (6)		$\chi^2=0,965$; p=0,58
APOA1	rs670	60,9 (157)		30,4 (103)		8,7 (27)		$\chi^2=2,464$; p=0,138
APOB	rs5742904	98,6 (361)		1,4 (5)		0,0 (0)		$\chi^2=0,017$; p=0,96
APOB	rs1042023	97,3 (285)		2,0 (6)		0,7 (2)		$\chi^2=0,003$; p=1
APOC3	rs5128	79,4 (227)		20,3 (58)		0,3 (1)		$\chi^2=0,059$; p=1
APOE	(rs429358 и rs7412)	$\epsilon 2/\epsilon 2$ 1,7 (15)	$\epsilon 2/\epsilon 4$ 1,3 (12)	$\epsilon 2/\epsilon 3$ 13,1 (117)	$\epsilon 3/\epsilon 3$ 64,3 (575)	$\epsilon 3/\epsilon 4$ 18,6 (166)	$\epsilon 4/\epsilon 4$ 1,0 (9)	$\chi^2=0,553$; p=0,89
CETP	rs708272	21,5 (187)		50,6 (440)		27,9 (243)		$\chi^2=2,920$; p=0,12
CLPS	rs2766597	99,2 (263)		0,8 (2)		0,0 (0)		$\chi^2=0,004$; p=0,99
LPL	rs320	6,6 (48)		40,4 (294)		53,0(385)		$\chi^2=1,498$; p=0,37
SCARB1	rs5888	19,0 (162)		48,5 (414)		32,5 (277)		$\chi^2=0,356$; p=0,66
SREBF2	rs2228314	50,7 (141)		39,6 (110)		9,7 (27)		$\chi^2=0,357$; p=0,631

Несмотря на то, что в исследовании не выявлены статистически значимые отличия в частоте аллелей и генотипов изученных вариантов в европеоидной популяции Западной Сибири в сравнении с европеоидными популяциями Центральной и Восточной Европы, экстраполировать результаты исследований, полученных на других популяциях, необходимо с предварительным анализом популяционной специфичности для каждого отдельного региона.

3.2 Результаты анализа спектра вариантов гена *LDLR* в популяционной группе с гиперхолестеринемией и группе с нормальными и низкими значениями ОХС

В европеоидной популяционной группе г. Новосибирска (Западная Сибирь) выполнено секвенирование промотора и экзонов гена *LDLR*.

Впервые полное секвенирование кодирующей части гена выполнено не только для больных с клиническими формами СГХС, но и для выборки случаев выраженной гиперхолестеринемии в популяционной группе. Молекулярно-генетические методы являются наиболее перспективными и доступными для диагностики функционально значимых нарушений структуры гена *LDLR*. В отличие от общепринятых критериев диагностики СГХС при формировании выборки не принимали в расчет значения уровней триглицеридов (ТГ) и холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС-ЛПВ). Описание обследованных лиц приведено в Главе 2, таблице 2.3 (стр. 74).

В нашем исследовании мы не обнаружили редких вариантов в промоторе, первом и восемнадцатом экзонах гена *LDLR* у лиц с гиперхолестеринемией. Выявлены ранее не описанные (по состоянию на 01.01.2008 года) варианты в экзоне 9 p.Arg410Gly (rs2077408020) и p.Met412Val (rs1225797407), в экзоне 12 p.Leu605Val (rs879255031), p.Leu605Arg (rs875989932) и p.Ala612Gly (rs377449975) (таблица 3.2.1) [310].

Выявлен ряд ранее описанных в других исследованиях редких вариантов в экзоне 5 Cys261Phe (rs121908040) и Glu240Ter (rs768563000), экзоне 6 Glu288Lys (rs368657165), экзоне 8 (Ala391Thr), экзоне 9 Glu418Gly, Leu432Arg (rs879254855), Asp433Glu (rs778309692), экзоне 11 (Glu558Lys) и экзоне 12 Gly592Glu (rs137929307) гена *LDLR* [142, 311-314].

Вариант p.Arg410Gly (rs2077408020, NC_000019.9:g.11223995A>G) был определен впервые. В настоящее время данный вариант выявлен у пациентов с СГХС в ряде других исследований [147] и обозначен в базе данных ClinVar (allele ID 847210) как «вероятно патогенный» [299].

Таблица 3.2.1 – Спектр вариантов гена *LDLR*, n=20

	Клинические группы с СГХС (Россия)	Популяционная группа с гиперхолестеринемией более 8,6 ммоль/л (Новосибирск)
Экзон 2	Glu8Ter, Gln12Ter	-
Экзон 3	Cys74Ter, c.230insG	-
Экзон 4	FsD97 (insTTCC) c.347-349delGCC Cys127Try, Ala130Pro Cys139Gly, Cys188Tyr c.651-653delTGG c.652-654delGGT c. 670-671insG Glu207Ter, Glu207Lys	-
Экзон 5	Cys249Ter	Cys261Phe, Glu240Ter
Экзон 6	c.925-931del17 c.936-940del5	Glu288Lys
Экзон 7	Cys308Tyr	-
Экзон 8	-	Ala391Thr
Экзон 9	Leu380His Arg395Try Glu397Ter c.1291-1331del41 c.1302delG Ile420Asn, Try422Arg	Arg410Gly* Met412Val* Glu418Gly Leu432Arg Asp433Glu
Экзон 10	Asp461Tyr	-
Экзон 11		Glu558Lys
Экзон 12	Pro556Ter Gly571Glu	Gly592Glu Leu605Val* Leu605Arg* Ala612Gly*
Экзон 13	c. 18855-1856insA Asp601Asn	-
Экзон 14	Cys646Ser	-
Экзон 15	Val698Leu, Thr705Ile	-
Экзон 16	Ile771Phe, Val776Met	-
Экзон 17	Val806Ile	-

* – варианты, описанные впервые в данном популяционном исследовании в 2008 г.

Секвенирование гена *LDLR* является высокоэффективным методом обследования для выявления лиц с предрасположенностью к формированию

гиперхолестеринемии в популяции и может использоваться в ретроспективных исследованиях. Генетические детерминанты наследственной патологии липидного обмена изучаются не только для выявления патологических фенотипов, но и для решения актуальных практических задач, включающих индивидуальный подход к профилактике и лечению нарушений липидного обмена. Молекулярно-генетические методы позволяют диагностировать нарушения липидного обмена в раннем возрасте, на доклинических стадиях развития заболеваний. В связи с этим, лицам с семейной гиперхолестеринемией, обусловленной патогенными вариантами в гене *LDLR*, комбинированная липид-снижающая терапия может быть назначена своевременно, до развития клинических проявлений ишемической болезни сердца и других осложнений.

На следующем этапе выполнена идентификация спектра вариантов в гене *LDLR* (n=20) в популяционной выборке лиц с нормальными и низкими значениями ОХС. Были выявлены варианты rs2228671, IVS7+10, rs5929.

У 7 (35%) обследованных в экзоне 2 определен синонимичный вариант rs2228671 (p.Cys27=, NC_000019.10:g.11100236C>T) в гетерозиготном варианте. По данным базы ClinVar [299] вариант относится к доброкачественным. Частота редкого аллеля Т составляет 10% в европеоидных популяциях [315]. В этой позиции описан также патогенный вариант p.Cys27Ter (C/A), который может быть причиной развития семейной гиперхолестеринемии [136, 316].

У 9 (45%) обследованных описан вариант IVS7+10 (rs12710260, NC_000019.9:g.11221457G>C). Частота редкого аллеля С=33% [317]. В этой позиции описан также патогенный вариант CS040544 (G/A), который ассоциирован с развитием семейной гиперхолестеринемии [136, 316, 318-320].

Синонимичный доброкачественный вариант rs5929 (p.Pro539=, NC_000019.9:g.11226800C>T) в гетерозиготном варианте определен в экзоне 11 у 5 (25%) из 20 обследованных лиц. Частота редкого аллеля Т составляет 4-5% в европеоидных популяциях по данным gnomAD [321].

Более высокая распространенность редких аллелей rs2228671, rs12710260 и rs5929 у лиц с нормальными и низкими значениями ОХС требует дальнейшего

изучения на больших по объему выборках для анализа их влияния на формирование липидного метаболизма.

Не выявлено редких патогенных вариантов у лиц с низкими и нормальными уровнями общего холестерина сыворотки. Обследованные лица с нормальными и низкими уровнями ОХС отличаются от группы пациентов с семейной гиперхолестеринемией по спектру вариантов в гене *LDLR*.

3.3 Анализ ассоциации вариантов генов липидного метаболизма с рядом биохимических показателей крови

На материале популяционной группы выполнены ассоциативные исследования однонуклеотидных вариантов генов *APOE*, *CETP*, *LPL* и *SCARB1* с рядом биохимических показателей: уровнями общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови, индексом атерогенности, уровнем глюкозы крови.

3.3.1 Варианты rs429358 и rs7412 гена *APOE*

В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири выполнен анализ ассоциации rs429358 и rs7412 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) гена *APOE* (n=894) с уровнями липидов крови (ОХС, ХС-ЛВП, ХС ЛНП, ТГ) и индексом атерогенности (таблица 3.3.1).

Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов были статистически значимы ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$. Минимальные значения среднего уровня ОХС определяются при генотипе $\epsilon 2/\epsilon 3$, статистически значимые при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 2/\epsilon 2$ ($p=0,002$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,002$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация пола ($p=0,0001$) и индекса массы тела с уровнем ОХС ($p=0,001$).

Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,001$) и для женщин ($p=0,007$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ОХС для мужчин ($p=0,0001$), но не для женщин ($p=0,158$).

Различия в средних уровнях ХС-ЛВП у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически не значимы ($p=0,776$). В общей линейной модели показано статистически значимая

ассоциация индекса массы тела и уровня ХС-ЛВП ($p=0,0001$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела и уровня ОХС для мужчин ($p=0,0001$), и наблюдалась тенденция ассоциации у женщин, не достигающее уровня статистической значимости ($p=0,034$).

Таблица 3.3.1 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE*

Генотипы	ОХС, ммоль/л	ХС- ЛВП, ммоль/л	ХС- ЛНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Индекс атерогенности, ед
$\epsilon 2/\epsilon 2$	$7,7 \pm 3,8$	$1,5 \pm 0,3$	$3,0 \pm 2,1$	$3,2 \pm 1,9$	$4,1 \pm 3,1$
$\epsilon 2/\epsilon 4$	$6,2 \pm 2,5$	$1,6 \pm 0,4$	$2,5 \pm 1,3$	$2,0 \pm 1,6$	$2,5 \pm 2,1$
$\epsilon 2/\epsilon 3$	$5,7 \pm 2,4$	$1,5 \pm 0,4$	$2,5 \pm 1,4$	$1,6 \pm 1,6$	$2,4 \pm 2,2$
$\epsilon 3/\epsilon 3$	$6,5 \pm 1,9$	$1,6 \pm 0,6$	$3,3 \pm 1,6$	$1,6 \pm 1,0$	$3,0 \pm 1,7$
$\epsilon 3/\epsilon 4$	$6,7 \pm 2,0$	$1,5 \pm 0,4$	$3,4 \pm 1,6$	$1,7 \pm 1,1$	$3,2 \pm 1,7$
$\epsilon 4/\epsilon 4$	$6,7 \pm 2,1$	$1,6 \pm 0,3$	$3,5 \pm 1,6$	$1,5 \pm 0,6$	$2,5 \pm 1,2$
(p)	0,0001*	0,776	0,0001*	0,0001*	0,0001*

Данные представлены как $M \pm SD$

p – уровень статистической значимости фактора

* – указывает на статистически значимый вклад фактора ($p < 0,01$)

Различия в средних уровнях ХС-ЛНП у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня ХС-ЛНП выявлено для генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$. Минимальные значения среднего уровня ХС-ЛНП определяются при генотипе $\epsilon 2/\epsilon 3$, статистически значимые при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,0001$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация пола с уровнем ХС-ЛНП ($p=0,0001$). Различия средних уровней ХС-ЛНП у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически

значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,001$), но не достигали уровня статистической значимости для женщин ($p=0,022$).

Различия в средних уровнях ТГ у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня ТГ выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$, статистически значимое при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 2/\epsilon 3$ ($p=0,0001$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,0001$), $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$) и $\epsilon 4/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ТГ ($p=0,0001$). Различия средних уровней ТГ у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,001$) и для женщин ($p=0,001$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ТГ для мужчин ($p=0,0001$) и для женщин ($p=0,009$).

Различия в средних уровнях индекса атерогенности (ИА) у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,0001$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ИА ($p=0,0001$). Различия средних уровней ИА у носителей разных генотипов полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,004$), но не достигали уровня статистической значимости для женщин ($p=0,038$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ТГ для мужчин ($p=0,0001$), но не для женщин ($p=0,017$).

В результате проведенного исследования выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* и некоторыми факторами риска атеросклероза. В европеоидной популяции Западной Сибири выявлено повышение средних уровней ОХС, ТГ, ИА для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$ и ХС-ЛНП для генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$. Подобный характер ассоциации уровней липидов крови с изученным полиморфизмом ранее был отмечен для ряда

популяций [107, 322, 323]. Выявленная ассоциация полиморфного варианта кодирующей части гена *APOE* с факторами риска атеросклероза подтверждает перспективность дальнейших исследований для оценки индивидуального риска развития атеросклероза.

Изменения углеводного обмена при гиперлипидемии III типа в европеоидной популяционной группе Западной Сибири: различия в средних уровнях глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,01$). Максимальное значение среднего уровня глюкозы крови выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$, статистически значимое при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 2/\epsilon 3$ ($p=0,006$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,009$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,005$). Носители гомозиготного генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$ в популяционной группе составляют 1,7%, у обследованных лиц с ОХС выше 7 ммоль/д – 2,8%.

Нарушения углеводного обмена играют важную роль в развитии ГЛП III и подтверждают перспективность изучения модифицирующей роли метаболических нарушений, с учетом структурных изменений генов, в формировании атерогенных форм дислипидемии.

3.3.2 Вариант rs708272 гена *CETP*

Уровень индивидуального риска развития сердечно-сосудистых заболеваний обусловлен как генетическими факторами, так и факторами образа жизни. В рамках настоящей работы выполнен анализ ассоциации варианта rs708272 гена *CETP* ($n=869$) с показателями ОХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ, индексом атерогенности (таблица 3.3.2).

Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически не значимы ($p=0,217$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация возраста ($p=0,001$) и индекса массы тела с уровнем ОХС ($p=0,001$). Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были не значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,298$) и для женщин ($p=0,590$). В общей линейной

модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ОХС для мужчин ($p=0,0001$), но не для женщин ($p=0,193$).

Таблица 3.3.2 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs708272 гена *СЕТР*

Генотипы	ОХС, ммоль/л	ХС- ЛВП, ммоль/л	ХС- ЛНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Индекс атерогенности, ед
AA	6,7±2,2	1,638±0,4	3,2±1,6	1,7±1,4	2,8±1,7
AG	6,6±2,2	1,526±0,4	3,3±1,7	1,7±1,1	3,0±1,7
GG	6,4±2,2	1,404±0,4	3,3±1,7	1,6±0,9	3,1±2,0
(p)	0,217	0,0001*	0,758	0,155	0,218

Данные представлены как $M \pm SD$

p – уровень статистической значимости фактора

* – указывает на статистически значимый вклад фактора ($p < 0,01$)

Различия в средних уровнях ХС-ЛВП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *СЕТР* были статистически значимы ($p=0,0001$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация пола ($p=0,0001$) и индекса массы тела с уровнем ОХС ($p=0,0001$). Различия средних уровней ХС-ЛВНП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *СЕТР* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,0001$), но не достигали уровня статистической значимости для женщин ($p=0,041$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ХС-ЛВП для мужчин ($p=0,006$) и для женщин ($p=0,002$).

Различия в средних уровнях ХС-ЛНП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *СЕТР* были статистически не значимы ($p=0,758$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация возраста ($p=0,002$) с уровнем ХС-ЛНП. Различия в средних уровнях ХС-ЛНП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *СЕТР* были не значимы при проведении анализа

отдельно для мужчин ($p=0,883$) и для женщин ($p=0,848$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ХС-ЛНП для мужчин ($p=0,002$) и возраста для женщин ($p=0,002$).

Различия в средних уровнях ТГ у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически не значимы ($p=0,155$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ТГ ($p=0,0001$). Различия в средних уровнях ТГ у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были не значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,100$) и для женщин ($p=0,480$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ТГ для мужчин ($p=0,0001$) и для женщин ($p=0,0001$).

Различия в средних значениях индекса атерогенности у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически не значимы ($p=0,218$). В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация возраста ($p=0,003$) и индекса массы тела ($p=0,0001$) с ИА. Различия в ИА у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были не значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,305$) и для женщин ($p=0,332$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ИА для мужчин ($p=0,0001$), индекса массы тела ($p=0,002$) и возраста для женщин ($p=0,001$).

Данные результаты не противоречат ранее проведенным исследованиям [125, 128, 129]. Например, в работе Gilberto Vargas-Alarcon и соавт., была показана ассоциация аллеля G с пониженной концентрацией ХС-ЛВП и повышенным риском острого коронарного синдрома ($ОШ = 1.45$, $p = 0.036$) [129]. В 2016 г Guo и соавторами на основании мета-анализа было установлена ассоциация между генотипом AA и более высоким уровнем ХС-ЛВП в сравнении с лицами с генотипом GG ($p<0.001$), а также повышенным риском сердечно-сосудистых событий у носителей аллеля G ($ОШ = 1.15$, $p<0.001$) у представителей, как азиатской, так и европеоидной популяции [128].

Высокий уровень ХС-ЛВП у лиц с гиперхолестеринемией может определяться как при непосредственном дефиците белка, переносящего эфиры холестерина (БПЭХ), так и в случае не эффективной работы рецептора ЛНП, когда высокие концентрации БПЭХ способствуют передаче эфиров холестерина к апоВ-содержащим липопротеинам без последующей их утилизации печенью. Это замедляет процесс обратного транспорта холестерина, что усиливает развитие атерогенных изменений [122].

3.3.3 Вариант rs320 гена *LPL*

Выполнен анализ ассоциации варианта rs320 (HindIII; T/G) гена липопротеинлипазы (*LPL*) с показателями липидного профиля крови – ОХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ, индексом атерогенности (таблица 3.3.3).

Таблица 3.3.3 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs320 гена *LPL*

Генотипы	ОХС, ммоль/л	ХС- ЛВП, ммоль/л	ХС- ЛНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Индекс атерогенности, ед
ТТ	6,6±2,2	1,5±0,4	3,3±1,7	1,8±1,1	3,0±1,7
ТG	6,5±2,3	1,6±0,4	3,3±1,7	1,6±1,2	2,9±2,0
GG	7,2±2,6	1,5±0,3	3,8±2,0	1,9±1,6	3,4±2,0
(p)	0,079	0,102	0,070	0,100	0,081

Данные представлены как $M \pm SD$

p – уровень статистической значимости фактора

* – указывает на статистически значимый вклад фактора ($p < 0,01$)

В европеоидной популяции Западной Сибири для генотипа GG варианта rs320 гена *LPL* характерно повышение средних уровней ОХС, ХС-ЛНП и ИА не достигающее уровня статистической значимости. Данные результаты не

противоречат предыдущим исследованиям, показывающим подобный характер ассоциации варианта rs320 гена *LPL* с липидным профилем в крови [155, 158, 160, 324].

В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнями ОХС, ХС-ЛНП, ТГ ($p=0,0001$). Различия в средних уровнях показателей липидного профиля крови и индекса атерогенности у носителей разных генотипов варианта rs320 гена *LPL* были не значимы при проведении анализа отдельно для мужчин и для женщин ($p>0,05$). В общей линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ОХС для мужчин ($p=0,0001$), но не для женщин ($p=0,417$).

Генотип GG варианта rs320 гена *LPL* статистически значимо не ассоциирован с показателями липидного профиля крови в европеоидной популяционной группе Западной Сибири.

3.3.4 Вариант rs5888 гена *SCARB1*

Выполнен анализ ассоциации варианта rs5888 гена *SCARB1* с показателями липидного профиля крови – общим ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ, индексом атерогенности (таблица 3.3.4).

Различия в средних уровнях показателей липидного профиля крови и индекса атерогенности у носителей разных генотипов варианта rs5888 гена *SCARB1* были статистически не значимы. В отличие от данных других исследований, показавших ассоциацию аллеля Т rs5888 низким риском ишемической болезни сердца [169] и низкими уровнями триглицеридов в плазме, особенно у мужчин [170].

В общей линейной модели показана статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнями ОХС, ХС-ЛНП, ТГ ($p=0,0001$). Различия в средних уровнях показателей липидного профиля крови и индекса атерогенности у носителей разных генотипов варианта rs5888 гена *SCARB1* были не значимы при проведении анализа отдельно для мужчин и для женщин ($p>0,05$). В общей

линейной модели сохранялась статистически значимая ассоциация индекса массы тела с уровнем ОХС для мужчин ($p=0,0001$), но не для женщин ($p=0,375$).

Таблица 3.3.4 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs5888 гена *SCARB1*

Генотипы	ОХС, ммоль/л	ХС- ЛВП, ммоль/л	ХС- ЛНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Индекс атерогенности, ед
СС	6,5±2,2	1,5±0,4	3,4±1,6	1,6±0,9	3,0±1,6
СТ	6,6±2,2	1,6±0,4	3,3±1,7	1,7±1,2	2,9±1,9
ТТ	6,6±2,2	1,5±0,4	3,3±1,6	1,7±1,1	3,1±1,9
(p)	0,995	0,110	0,795	0,988	0,554

Данные представлены как $M \pm SD$

p – уровень статистической значимости фактора

* – указывает на статистически значимый вклад фактора ($p < 0,01$)

Проведенное исследование ряда вариантов генов *APOE*, *CETP*, *LPL*, и *SCARB1* подтверждает перспективность анализа ассоциаций полиморфизма генов с липидными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний и метаболического синдрома для изучения и оценки индивидуального риска развития дислипидемии с учетом имеющегося мирового опыта.

3.4 Генетические компоненты формирования промежуточных фракций липопротеинов низкой плотности

Выполнен анализ промежуточных фракций липопротеинов низкой плотности в популяционной группе населения г. Новосибирска ($n=60$), в группе с гиперхолестеринемией более 8,0 ммоль/л ($n=60$) и группе со значениями общего холестерина сыворотки менее 5,2 ммоль/л ($n=60$). Группы с гиперхолестеринемией и с нормальными и низкими значениями общего холестерина сыворотки были выбраны из основной выборки ($n=909$) методом случайных чисел.

Липопротеины низкой плотности — это разнородный класс частиц, внутри градиента плотности (1,019-1,063 г/мл) которых обнаружены субпопуляции частиц. Частицы различных субпопуляций отличаются как по физико-химическим, так и по биологическим свойствам [325]. Максимальное содержание холестерина и эфиров холестерина, пониженное содержание белка аполипопротеина Е и высокая способность к окислению характерна для мелких плотных частиц липопротеинов низкой плотности [326].

У обследованных лиц с гиперхолестеринемией более 8,0 ммоль/л (309 мг/дл) максимальное количество частиц липопротеинов низкой плотности отмечено в точке $249,9 \pm 4,3 \cdot 10^{-10}$ м. У обследованных лиц с уровнем общего холестерина сыворотки менее 5,2 ммоль/л (<200 мг/дл) максимальное количество частиц липопротеинов низкой плотности было в точке $237,8 \pm 3,4 \cdot 10^{-10}$ м. У обследованных из популяционной выборки максимальное количество частиц липопротеинов низкой плотности находился в точке $247,2 \pm 3,1 \cdot 10^{-10}$ м. Максимальное количество частиц липопротеинов низкой плотности статистически значимо различалось между тремя группами (таблица 3.4.1).

Минимальный размер частиц липопротеинов низкой плотности на пике профиля их распределения выявлен в группе лиц со значениями общего холестерина сыворотки менее 5,2 ммоль/л: меньше в сравнении с группой с гиперхолестеринемией и популяционной группой на 5,0% и 4,0% ($p<0,05$), соответственно.

Таблица 3.4.1 – Характеристика субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности ($M \pm m, \sigma$)

Показатели профиля частиц липопротеинов низкой плотности	Обследованные группы			
	Группа с высокими значениями ОХС (n=60)	Группа с нормальными и низкими значениями ОХС (n=59)	Популяционная группа (n=59)	Отличия между группами
Пик размера частиц, 10^{-10} м	249,9 $\pm$ 4,3	237,8 $\pm$ 3,4*	247,2 $\pm$ 3,1	2 vs 1 и 3
Начало профиля ЛНП, 10^{-10} м	312,5 $\pm$ 3,4*	320,2 $\pm$ 2,9	322,8 $\pm$ 2,4	1 vs 3
Конец профиля ЛНП, 10^{-10} м	175,8 $\pm$ 3,8**	162,9 $\pm$ 2,6	169,3 $\pm$ 2,9	1 vs 2
Ширина профиля ЛНП, 10^{-10} м	136,7 $\pm$ 4,4**	157,4 $\pm$ 3,2	153,5 $\pm$ 3,0	1 vs 2 и 3
Присутствие минорного пика на нисходящем профиле частиц ЛНП	n=30 50,0%*	n=25 42,4%	n=18 30,5%	1 vs 3
Атерогенный профиль Субфракций ЛНП	n=19 31,6%	n=18 30,5%	n=12 20,3%	

Примечание: М – средняя арифметическая, m – ошибка средней, σ - стандартное отклонение;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

Ширина профиля частиц липопротеинов низкой плотности оказалась минимальной у обследованных лиц с гиперхолестеринемией: меньше на 13,0% и 11,0% ($p < 0,01$), соответственно, чем у обследованных лиц с нормохолестеринемией и из популяционной подгруппы. Данные значения обусловлены самым малым средним значением размера частиц начала профиля и самым большим средним значением размера частиц конца профиля липопротеинов низкой плотности у обследованных лиц с гиперхолестеринемией.

Присутствие минорного пика частиц на нисходящей кривой субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности выявлено в 50% случаев у обследованных лиц с общим холестерином сыворотки более 8,0 ммоль/л. В 42,4% минорный пик определен в группе лиц с общим холестерином сыворотки менее 5,2 ммоль/л и в 30,5% в популяционной группе лиц. Выявлено статистически значимое различие в присутствии минорного пика частиц между группами. У обследованных лиц с общим холестерином сыворотки более 8,0 ммоль/л количество минорных пиков на нисходящей кривой субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности выше в 1,6 раза ($p < 0,05$).

Определена распространенность атерогенного субфракционного профиля в обследованных группах. Атерогенный субфракционный профиль частиц липопротеинов низкой плотности характеризуется смещением субфракционного профиля липопротеинов низкой плотности в сторону преобладания мелких плотных частиц и наличием пика частиц в диапазоне $\leq 220 \cdot 10^{-10}$ м. Атерогенный профиль был выявлен в 31,6% у обследованных лиц с ГХС, в 30,5% случаев в группе лиц с нормохолестеринемией и в 20,3% в популяционной группе. Статистически значимых различий по данному показателю не выявлено в изученных группах.

Субфракционный профиль частиц липопротеинов низкой плотности у лиц с гиперхолестеринемией более 8,0 ммоль/л характеризуется меньшей протяженностью и наличием дополнительного минорного пика на нисходящей кривой профиля.

Ассоциации между размером частиц липопротеинов низкой плотности и уровнем общего холестерина сыворотки у обследованных лиц не выявлено ($p > 0,05$). Ассоциации между профилем промежуточных фракций частиц и вариантами генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *SCARB1* и *SREBF2* не выявлено.

Проведен анализ ассоциации варианта rs320 гена *LPL* с субфракционным профилем частиц липопротеинов низкой плотности. Механизмы образования промежуточных фракций могут отличаться. В результате действия

липопротеинлипазы на поверхности сосудистого эндотелия происходит гидролиз триглицеридов липопротеинов очень низкой плотности. ЛОНП превращаются сначала в меньшие по размеру и обогащенные холестерином липопротеины промежуточной плотности, а затем в липопротеины низкой плотности, богатые холестерином [184, 327].

Мелкие частицы ЛОНП содержат 1-2 молекулы аполипопротеина Е на частицу и медленно элиминируются этим рецепторным путем, длительно циркулируют в крови, подвергаясь процессам липолитической деградации, и превращаются в промежуточные фракции липопротеинов низкой плотности [328, 329].

С другой стороны, Fisher R.M. и соавторы (1995) при исследовании чувствительности триглицерид-богатых промежуточных фракций ЛОНП к гидролизу липопротеинлипазой *in vitro* выявили, что ЛПЛ действует преимущественно на большие частицы ЛОНП. Большой размер и повышенное содержание ТГ в частицах ЛОНП приводят к повышению их чувствительности к гидролизу ЛПЛ (рисунок 3.4.1) [330].

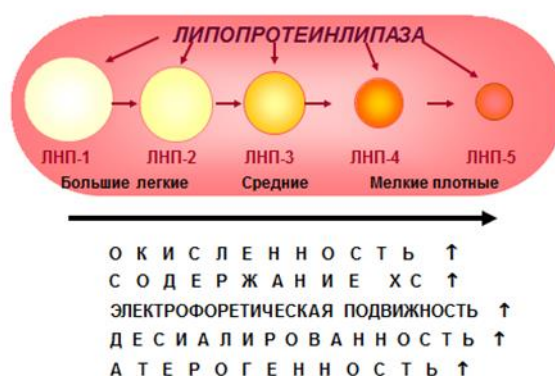


Рисунок 3.4.1 – Изменения частиц липопротеинов низкой плотности под действием липопротеинлипазы

В данном исследовании выявлена ассоциация варианта rs320 гена *LPL* с минорным пиком частиц на нисходящей кривой профиля липопротеинов низкой плотности ($p=0,02$). У носителей генотипа ТТ варианта rs320 гена *LPL* наблюдается

минимальная частота наличия минорного пика частиц на нисходящей кривой профиля липопротеинов низкой плотности в сравнении с носителями генотипа GG. Снижение активности липопротеинлипазы приводит к снижению образование мелких плотных частиц, богатых холестерином и повышается содержание частиц, богатых триглицеридами [331], что может приводить к развитию комбинированной дислипидемии.

3.5 Анализ генов, ассоциированных с семейной гиперхолестеринемией, методами высокопроизводительного секвенирования и мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб

Получены данные таргетного высокопроизводительного секвенирования ДНК 43 генов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена у пациентов с фенотипом СГХС. Таргетная панель включала кодирующие участки и прилегающие сайты сплайсинга (по 100 п.н.), а также 1000 п.н. 3' и 5'UTR областей генов: *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *CETP*, *LPL*, *HMGCR*, *NPC1L1*, *PPARA*, *MTTP*, *LMF1*, *SAR1B*, *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5*, *APOA1*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE*, *LCAT*, *ANGPTL3*, *LIPC*, *APOA4*, *APOC3*, *SREBF1*, *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *POLD1*, *LPA*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, *SMAD9*, *LIPG*.

Гены *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ассоциированы с аутосомно-доминантной формой СГХС; гены *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1* ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой СГХС; гены *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5* ассоциированы с вариациями фенотипа СГХС, включая развитие гипертриглицеридемии; редкие варианты в генах аполипопротеинов и других генах липидного обмена могут быть причиной развития у пациентов фенотипа подобного СГХС [225, 229, 236, 239, 255].

Таргетное секвенирование проведено для 34 пациентов с диагнозом «определенная» СГХС (DLCN>8 баллов), 5 пациентов с диагнозом «вероятная» СГХС (DLCN 6-8 баллов) и 41 пациента с диагнозом «возможная» СГХС (DLCN 3-5 баллов).

Группа пациентов включала 60 пробандов и 20 родственников пробандов. Среди родственников пробандов 70 % (n=14) составляли дети пробандов. Патогенетически значимые варианты в генах, ассоциированных СГХС, определены у 47,5% обследованных лиц. Как и в других исследованиях, это подтверждает эффективность применения стратегии каскадного генетического скрининга [203].

3.5.1 Редкие варианты в гене *LDLR* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

При молекулярно-генетическом исследовании получены данные о наличии ряда структурных вариантов в гене *LDLR* у пациентов с СГХС.

У 19 пробандов (73,1 % от всех выявленных у пробандов вариантов) определены патогенетически значимые варианты в гене *LDLR*. У 10 детей пробандов (71,4%) выявлены патогенетически значимые варианты в гене *LDLR*. Из родственников пациентов первой линии родства (мать, отец, родные братья и сестры) в одном случае выявлен патогенный вариант в гене *LDLR*.

Все миссенс варианты представлены в гетерозиготной форме (таблица 3.5.1).

Ряд выявленных вариантов Cys352Tyr, Cys340Phe и Leu401His был ранее описан у пациентов с СГХС в России [142] и в других странах [332, 333-339].

Наиболее распространенный вариант – rs121908038 (p.Leu401His) – встречался в трех неродственных семьях пациентов из Западной Сибири. Данный вариант также описан у пациентов в Санкт-Петербурге [142] и Финляндии [339].

Выявление новых случаев индексных пациентов необходимо для, как можно более раннего выявления и лечения пациентов с СГХС, с целью снижения сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности у этих пациентов с высоким риском.

У пациентов с СГХС также определен ряд однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) гена *LDLR*. Rs688, синонимичный вариант Asn591Asn, по данным литературы ассоциирован с повышением ОХС, но не с фенотипом СГХС, за счет влияния на сплайсинг 12 экзона гена *LDLR* [334].

Другой синонимичный ОНП Val526Val (rs5925) влияет на эффективность сплайсинга 13 экзона гена *LDLR*, что является причиной снижения функциональной активности рецептора ЛНП [335].

ОНП в гене *LDLR* не ассоциированы с развитием фенотипа СГХС, но могут участвовать в повышении уровня ОХС и ХС-ЛНП.

Таблица 3.5.1 – Варианты в гене *LDLR* у пациентов с СГХС

Номер пациента	Номер позиции в референсной последовательности	Позиция на хромосоме (GRCh38)	Замена нуклеотидов	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля (MAF) по данным базы GnomAD	Клиническое значение по данным базы ClinVar
P28, P40, P41, P42, P55, P56	rs121908038	19:11113293	c.1202T>A	p.Leu401His	ND	Likely Pathogenic
P45	rs137853964	19:11129602	c.2479G>A	p.Val827Ile	A=0.001006	Likely Pathogenic
P22, P36, P58	rs28942078	19:11113376	c.1285G>A	p.Val429Met	A=0.000012	Pathogenic/ Likely Pathogenic
P65	rs539080792	19:11221396	c.1009G>A	p.Glu337Lys	A=0.000104	Uncertain Significance
P47	rs570942190	19:11113337	c.1246C>T	p.Arg416Trp	T=0.000024	Not reported in ClinVar
P67, P68	rs755757866	19:11110730	c.1019G>T	p.Cys340Tyr	T=0.000008	Likely Pathogenic
P7	rs761954844	19:11110697	c.986G>A	p.Cys329Tyr	A=0.000016	Likely Pathogenic
P35	rs879254566	19:11105440	c.534TT>G	p.Asp178Glu	ND	Pathogenic/ Likely Pathogenic
P38, P39	rs879254721	19:11107496	c.922G>A	p.Glu308Lys	ND	Pathogenic
P2	rs879254980	19:11116179	c.1672G>T	p.Glu558Ter	ND	Pathogenic
P24, P25, P26, P81, P82	rs879255191	19:11128090	c.2389+5G>A	-	ND	Conflicting Interpretations of Pathogenic
P52	rs875989907	19:11106666	c.796G>A	p.Asp266Asn	A=0.000012	Pathogenic
	rs879254769	19:11110765	c.1054T>C	p.Cys352Ser	ND	Likely Pathogenic
P10	rs875989894	19:11213415	c.266G>C	p.Cys89Ser	ND	Pathogenic/Likely Pathogenic
	ND	19:11222252	c.1123T>G	p.Tyr375Asp	ND	Novel variant

НД – нет данных

3.5.2 Клинические случаи: компаунд гетерозиготы в гене *LDLR*

У двух неродственных пробандов с клиническим течением заболевания, соответствующим гомозиготной форме СГХС, определены компаунд гетерозиготы в гене *LDLR*. Наличие различных «патогенных» вариантов в одном и том же гене характеризует индивидуума как компаунд гетерозиготу. Фенотипические проявления СГХС у носителей компаунд гетерозигот соответствуют проявлениям гомозиготной формы СГХС, с ранним развитием атеросклеротического процесса и формированием сердечно-сосудистых осложнений в молодом возрасте.

В первом случае у пациентки P52 28 лет с диагнозом СГХС «определенная», DLCN 18 баллов, в анамнезе инфаркт миокарда в возрасте 24 лет; чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика в возрасте 25 и 26 лет были определены редкие варианты chr19:11217342 и chr19:11221441 в экзонах 5 и 7 гена *LDLR* (таблица 3.5.1). На фоне приема липид-снижающих препаратов уровень ОХС составил 18,6 ммоль/л, ХС-ЛНП – 15,2 ммоль/л. В семейном анамнезе у матери и родного брата матери пациентки были перенесенные острые коронарные события в возрасте до 40 лет и наблюдались повышены уровни ОХС. Материал родственников не был доступен для исследования.

Во втором случае у пациентки P10 35 лет с диагнозом СГХС «определенная», DLCN 18 баллов, в анамнезе инфаркт миокарда в возрасте 24 лет; маммарокоронарное шунтирование в возрасте 24 лет; повторный инфаркт миокарда в 34 года; были определены редкие варианты в 3 и 8 экзонах гена *LDLR*. Один из вариантов определен в позиции chr19:11213415 (NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S), ранее в этой позиции был описан редкий «патогенный» вариант rs875989894 с заменой G>A (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000092111#00011039> от 01.10.2021). Другой вариант локализован в chr19:11222252, он описан впервые: NM_000527:exon8:c.T1123G:p.Y375D (таблица 3.5.1). До начала лечения липид-снижающими препаратами уровень ОХС был 25,0 ммоль/л, ХС-ЛНП – 11,94 ммоль/л. У матери пациентки не наблюдалось клиники СГХС и при проведении

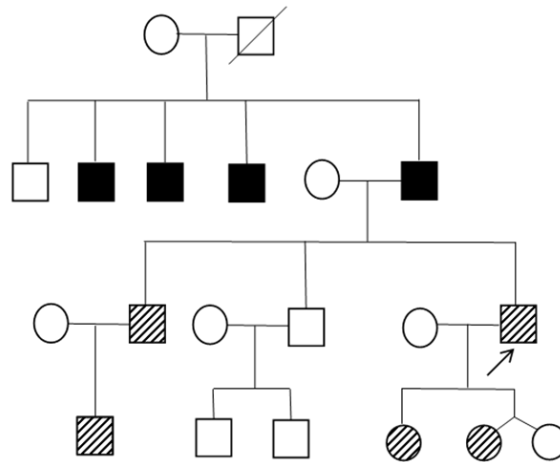
молекулярно-генетического исследования патогенных вариантов в генах липидного обмена не выявлено. У отца пациентки наблюдается клиника СГХС, от участия в молекулярно-генетическом исследовании пациент отказался.

Клиника гомозиготной формы СГХС с ранним развитием тяжелых осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы характерна для пациентов с компаунд гетерозиготами в гене *LDLR* для различных популяций [336].

3.5.3 Клинический случай: редкий вариант в регуляторном районе гена *LDLR*

Пациент Р24, 45 лет (на момент первичного осмотра в 2014 г.). В анамнезе с подросткового возраста артериальная гипертензия 2 ст., на гипотензивной терапии достигнуты целевые значения АД. С 2011 г. клиника стенокардии напряжения. 28.11.2011 перенес инфаркт миокарда. Семейный анамнез: отец пациента перенес ОИМ в 45 лет, смерть от неизвестной причины в 53 года; у трех родных братьев отца пациента в анамнезе перенесенные ОИМ в возрасте 50-53 лет. У старшего брата пациента (53 г.) – гиперхолестеринемия, ИБС (рисунок 3.5.1).

При осмотре неравномерное утолщение ахилловых сухожилий обеих ног до 1,7 см. Лабораторные данные: ОХС 11,5 ммоль/л; ТГ 1,08 ммоль/л; ХС-ЛВП 0,89 ммоль/л; ХС-ЛНП 10,12 ммоль/л. Коронароангиография: стеноз средней трети передней нисходящей артерии (ПНА) – 99 %, стеноз средней трети огибающей артерии (ОА) – 98 %. Проведено стентирование ПНА и ОА. УЗИ БЦА (2016): КИМ слева 1,22 мм, справа 0,6 мм; АСБ ОСА слева 21 %, справа 30 %. Диагноз: семейная гиперхолестеринемия, определенная (критерии DLCN – 26 баллов). ИБС. ПИКС (2011г). ЧТКА со стентированием ПКА и ОА (2012). Атеросклероз аорты и сонных артерий. Гипертоническая болезнь III ст., 2 степени, риск 4. ХСН I. ФК I (NYHA).



↗ - пробанд

▨, ⊗ - пациенты – носители варианта rs879255191

■ - мужчины, перенесшие ИМ в возрасте до 53 лет

◻ - погиб в возрасте до 40 лет

Рисунок 3.5.1 – Редкий вариант в регуляторном районе гена *LDLR*

Биоинформационный анализ полученных данных выявил вариант rs879255191 (с.2389+5G>A) в гетерозиготной форме в гене *LDLR*. Обнаруженный вариант был верифицирован прямым секвенированием по Сэнгеру.

Данная замена находится в высококонсервативном динуклеотиде AG донорного сайта сплайсинга интрона 16. Для анализа функциональной значимости обнаруженной замены использовали программу SPANR [337]. Согласно оценке SPANR, изменение вероятности включения экзонов в мРНК в разных тканях при наличии обнаруженного варианта составило -13.47 баллов, включение экзонов 14-16 в транскрипты гена будет снижено. Ранее rs879255191 была описана у больных СГХС, в том числе в России [338].

Вариант rs879255191 выявлен также у родного брата (P81) и племянника пробанда (P82), имеющего клинику СГХС и перенесенный инфаркт миокарда в возрасте 44 лет.

Используя принцип каскадного скрининга, обследованы дочери пробанда (P26 возраст 8 лет, P25 возраст 7 лет, P27 возраст 7 лет). ОХС составил для P26 – 6,6 ммоль/л, P25 – 6,6 ммоль/л, P27 – 4,2 ммоль/л; ХС-ЛНП 4,69 ммоль/л, 4,28 ммоль/л и 2,17 ммоль/л, соответственно. Выполнена ДНК диагностика: выявлен вариант rs879255191 в гетерозиготной форме у P26 и P25, и не обнаружен у P27.

Раннее выявление СГХС и оптимальное снижение уровня ХС-ЛНП улучшает качество и продолжительность жизни пациентов.

3.5.4 Клинический случай: диагностика гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии в молодом возрасте

Пациентка, 16 лет, обратилась в Городской липидный центр при НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН в 2020 г. Жалоб на момент обращения нет. В анамнезе в 2019 г. при двукратном измерении выявлено повышение уровней ОХС до 10,3 ммоль/л и ХС ЛНП до 7,5 ммоль/л. Семейный анамнез не отягощен по ранним сердечно-сосудистым заболеваниям атеросклеротического генеза. При осмотре сухожильных ксантом, липоидной дуги роговицы, ксантелазм не выявлено.

По данным лабораторного обследования: ОХС 10,30 ммоль/л; ТГ 0,82 ммоль/л; ХС-ЛВП 1,44 ммоль/л; ХС-ЛОНП 0,38 ммоль/л; ХС-ЛНП 7,50 ммоль/л; глюкоза 5,0 ммоль/л. По данным ультразвукового исследования брахиоцефальных артерий не обнаружено утолщения комплекса интима-медиа и атеросклеротических бляшек.

Диагноз определенной семейной гиперхолестеринемии выставлен пациентке согласно критериям Европейского общества по атеросклерозу (уровень ХС ЛНП $\geq$ 4,9 ммоль/л в двух последовательных анализах на фоне соблюдения гиполипидемической диеты в течение 3 месяцев) [191].

В течение 3 месяцев пациентка соблюдала гиполипидемическую диету и принимала эзетемиб 10 мг/сут, без достижения целевого уровня ХС-ЛНП менее 3,5 ммоль/л (ОХС 9,6 ммоль/л, ХС-ЛНП – 7,1 ммоль/л).

Пациентке выполнено таргетное секвенирование 43 генов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена, на платформе Illumina (USA). Биоинформационный анализ полученных данных выявил замену rs879254721 NM_000527.5(LDLR):c.922G>A (p.Glu308Lys) в гене *LDLR* в гетерозиготном варианте. Вариант rs879254721 индексируется в базе данных HGMD (CM066911) и ClinVar ID: 251528 как «вероятно патогенный» (рисунок 3.5.2).

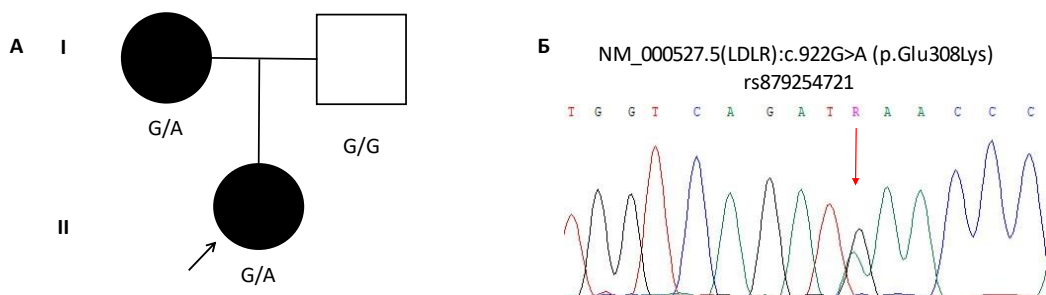


Рисунок 3.5.2 – А. Семейная история и миссенс вариант rs879254721 NM_000527.5(LDLR):c.922G>A (p.Glu308Lys) гена *LDLR* в семье с наследственной гиперхолестеринемией. Черным выделены члены семьи с фенотипом СГХС. G/A-носитель миссенс мутации p.Glu308Lys в гетерозиготном варианте; G/G – носитель дикого варианта.

Б. Электрофореграмма последовательности с вариантом rs879254721 NM_000527.5(LDLR):c.922G>A (p.Glu308Lys) гена *LDLR*.

В рамках проведения каскадного скрининга были обследованы родители пациентки. У матери пробанда (46 лет) уровень ОХС 7,12 ммоль/л; ТГ 1,00 ммоль/л; ХС-ЛВП 1,40 ммоль/л; ХС-ЛНП 5,27 ммоль/л; глюкоза 5,5 ммоль/л. При ультразвуковом обследовании брахиоцефальных артерий выявлено утолщение комплекса интима-медиа до 1,1 мм, атеросклеротических бляшек нет. У отца пробанда уровень ХС ЛНП составил 4,1 ммоль/л. Атеросклеротических бляшек и утолщения комплекса интима-медиа не обнаружено. Молекулярно-генетическое исследование выполнено у матери и отца пробанда. У матери пробанда выявлен вариант rs879254721 (p.Glu308Lys) в гене *LDLR* в гетерозиготном варианте.

После подтверждения диагноза СГХС пациентке назначена терапия аторвастатином 20 мг, на фоне которой уровень ХС ЛНП снизился до 3,6 ммоль/л.

Для верификации фенотипа СГХС оптимально использовать принцип каскадного генетического скрининга. В случае семейного анамнеза СГХС или раннего развития ИБС, ОХС и ХС-ЛНП определяются у членов семьи пробанда, начиная с возраста 2 лет [192]. Пациентам молодого возраста должна быть назначена адекватная липидснижающая терапия.

Независимо от генетического тестирования, все семьи с СГХС, требуют постоянного наблюдения и целенаправленного клинического обследования, для выявления родственников из группы риска.

3.5.5 Определение делеций и дупликаций в гене *LDLR* методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA)

Сорока двум пациентам, без функционально-значимых замен в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, был выполнен MLPA анализ для определения структурных изменений (делеции, дупликации) промотора и экзонов гена *LDLR*.

Проведенный анализ выявил делеции в образцах ДНК двух неродственных пациентов. В первом случае делеция NM_000527.4:c.(67+1_68-1)_(1586+1_1587-1)del в гетерозиготной форме затрагивала участок со 2 по 10 экзоны (рисунок 3.5.2a), во втором – пациент являлся носителем делеции 15 экзона гена *LDLR* NM_000527.4:c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del в гетерозиготной форме (рисунок 3.5.2b).

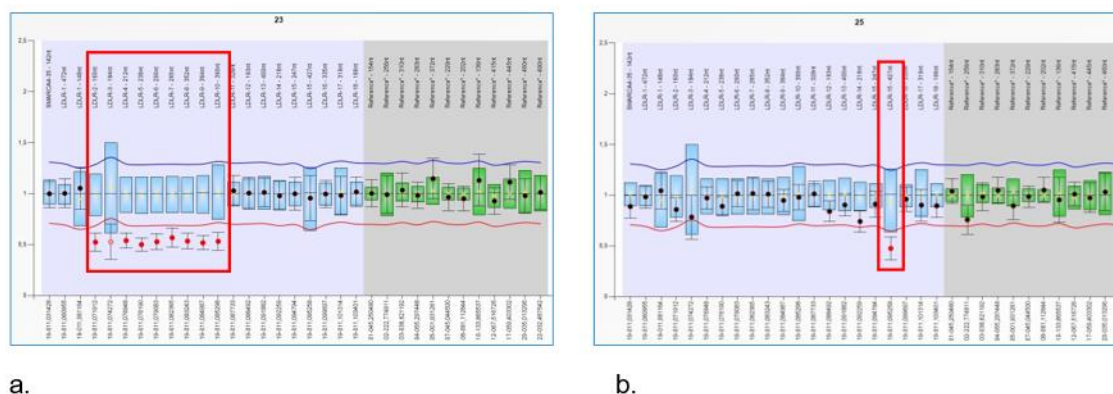


Рисунок 3.5.3 – Делеция экзонов *LDLR* 2–10 (а) и экзона 15 (б) у пациентов с СГХС

У пациентки Р33 (31 год) с делецией 2-10 экзон уровень ОХС составил 10,96 ммоль/л, ХС-ЛНП – 7,76 ммоль/л (DLCN – 6 баллов), в семейном анамнезе описаны случаи смерти от ИМ в возрасте до 50 лет по отцовской линии. На момент осмотра липид-снижающие препараты не принимала. Впервые эта делеция была описана в 2010 году в исследовании French Autosomal Dominant Hypercholesterolemia Research Network [138].

У пациентки Р5 (69 лет) с делецией 15 экзона уровень ОХС составил 6,6 ммоль/л, ХС-ЛНП – 3,8 ммоль/л на фоне приема 10 мг Rosuvastatin. Подобная делеция 15 экзона гена *LDLR* была описана в работе Koivisto P.V. с соавт., 1992 [339].

3.5.6 Редкие варианты в гене *APOB* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

При молекулярно-генетическом исследовании получены данные о наличии ряда структурных изменений в гене *APOB* у пациентов СГХС (таблица 3.5.2).

У трех пациентов из двух неродственных семей (пробанд и сын пробанда из одной семьи и пробанд из другой семьи) определен «патогенный» вариант

rs5742904 NM_000384.3(APOB):c.10580G>A (p.Arg3527Gln). Частота редкого аллеля T=0.000275 представлена по данным базы GnomAD [290].

Таблица 3.5.2 – Редкие варианты в генах *APOB*, *ABCG5*, *APOC3*, *LPL*, *SREBF1* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Номер пациента	Номер позиции в референсной последовательности	Позиция на хромосоме	Замена нуклеотидов	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля (MAF) по данным базы GnomAD	Клиническое значение по данным базы ClinVar
<i>APOB</i>						
P11, P15, P71	rs5742904	2:21006288	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	T=0.000275	Pathogenic
<i>ABCG5</i>						
P74	rs145164937	2:43832056	c.293C>G	p.Ala98Gly	C=0.002223	Conflicting interpretations of pathogenicity
<i>APOC3</i>						
P59	rs138326449	11:116830638	c.55+1G>A	-	C=0.002244	Conflicting interpretations of pathogenicity
<i>LPL</i>						
P9	rs118204077	8:19955873	c.808C>T	p.Arg270Cys	C=0.0001	Pathogenic
<i>SREBF1</i>						
P83, P84	rs115855236	17:17820281	c.422C>T	p.Pro141Leu	A=0.001210	Not reported in ClinVar

В результате вариабельности участка гена *APOB*, кодирующего сайт связывания с рецептором ЛНП, развивается гиперхолестеринемия [340, 341]. Один из вариантов данного участка – rs5742904 – приводит к развитию гиперхолестеринемии со сниженным клиренсом ЛНП вследствие дефекта структуры ЛНП, обеспечивающей сродство с рецептором ЛНП [342].

В первой семье пациент P71 (36 лет) был носителем варианта rs5742904, с уровнем общего холестерина - 7,75 ммоль / л и холестерина ЛПНП 5,76 ммоль / л на фоне приема 10 мг розувастатина (оценка DLCN 12 баллов; при осмотре выявлены ксантомы). Отец пациента перенес инфаркт миокарда в 50 лет и умер от второго инфаркта миокарда в 62 года; мать отца умерла от ишемического инсульта в возрасте 60 лет. У сына (13 лет, пациент P11) пациента P71 уровень общего холестерина 6,9 ммоль / л и он также является носителем варианта rs5742904.

Во второй семье у пациента P15 (25 лет) – носителя варианта rs5742904 – уровень общего холестерина составлял 7,5 ммоль / л, ХС-ЛПНП 5,7 ммоль / л, с оценкой DLCN 11 баллов.

Клинический эффект rs5742904 обозначен как патогенный (27 исследований) по базе данных ClinVar [299].

3.5.7 Варианты в гене *PCSK9*

Для России актуально изучение популяционной специфичности вариантов гена *PCSK9*.

У двух пациентов с клиническим диагнозом СГХС определен вариант rs505151 (Chr1:55063514, Glu670Gly) в гетерозиготной форме. Выявленный в нашем исследовании у пациентов с гетерозиготной формой СГХС вариант Glu670Gly, приводящий к замене глутаминовой кислоты на глицин, относится к вариантам усиления функции *PCSK9*. По результатам ряда исследований, вариант Glu670Gly независимо и положительно связан с уровнем холестерина ЛНП: редкий генотип GG ассоциирован с повышением ХС-ЛНП и/или развитием ИБС [206].

Аллель G варианта Glu670Gly редко встречается у европеоидов, но присутствует примерно у 24,8% представителей негроидной расы [212].

У одного пациента с клиническим диагнозом СГХС выявлен редкий вариант rs11591147 (Chr1:55039974, Arg46Leu) в гетерозиготной форме. Rs11591147 относится к вариантам потери функции. Вариант R46L (rs11591147) гена *PCSK9* связан со снижением уровня ХС-ЛНП и снижением риска развития ИБС. Данный вариант также может быть выявлен у лиц с нормо- или гипер-холестеринемией, вследствие совокупности действия других генетических и средовых факторов, влияющих на уровень холестерина [206]. У данного пациента (P15) при обследовании найден также функционально значимый для развития СГХС вариант в гене *APOB* (rs5742904).

Кроме ранее описанных в базах данных, клинически значимых вариантов, выявлены следующие структурные варианты в гене *PCSK9*, представленные преимущественно в интронах гена (таблица 3.5.3).

Таблица 3.5.3 – Варианты в гене *PCSK9*

Номер позиции в референсной последовательности	Позиция на хромосоме	Локализация	Частота редкого аллеля (GnomAD)
rs479832	Chr1:55049864	интрон	C=0.31
rs483462	Chr1:55059727	интрон	G=0.33
rs498588	Chr1:55062762	интрон	T=0.028
rs499718	Chr1:55046876	интрон	T=0.26
rs502576	Chr1:55047209	интрон	C=0.14
rs509504	Chr1:55057360	синонимичная замена Q>Q	A=0.018
rs516499	Chr1:55061012	интрон	G=0.13
rs529787	Chr1:55047848	интрон	G=0.10
rs531701	Chr1:55048052	интрон	T=0.26

Использование технологии высокопроизводительного секвенирования позволяет получить полную информацию о вариабельности структуры гена. Внедрение в клиническую практику молекулярно-генетического исследования гена *PCSK9* позволит дополнить существующую молекулярно-генетическую диагностику вариантов в генах *LDLR* и *APOB* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в России.

3.5.8 Варианты в гене *LDLRAP1*

У пациентов с СГХС были идентифицированы rs28969504 (доброкачественный вариант, $A=0.37$) и rs6687605 (доброкачественный вариант, $C=0.47$) в кодирующей области гена *LDLRAP1*.

Более 10 нуклеотидных замен было локализовано в интронах гена *LDLRAP1*, две из которых IVS1-455A>G и IVS8 + 3510G>T описаны впервые. Описана одна делеция нуклеотида A в позиции 640 промоторной области. Выявленные ОНП и короткие делеции могут быть интересны для дальнейших исследований у пациентов с нарушениями липидного обмена.

3.5.9 Редкие варианты в генах *ABCG5*, *APOC3*, *LPL*, *SREBF1* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Редкий вариант rs145164937 в гене *ABCG5* в гетерозиготной форме определен у одного из пробандов P74 (женщина, 38 лет) с уровнем ОХС 8,3 ммоль/л, ХС-ЛНП – 5,4 ммоль/л, DLCN – 3 балла (таблица 3.5.2, стр. 126). Частота редкого аллеля $C=0.002223$ для European (non-Finnish) по данным базы GnomAD [290]. Это известный патогенный вариант HGMD CM169023. При анализе с использованием PolyPhen-2 для варианта rs145164937 (NM_022436; p.Ala98Gly; c.293C>G) вероятность повреждающего действия на белковый продукт составила score 0.977. Ранее в работе Helgadottir A. с соавторами, 2020 была показана ассоциация rs145164937 с ХС-не-ЛНП [343].

При анализе результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования в гене *APOC3* выявлен вариант rs138326449 (IVS2+1G>A) в гетерозиготной форме (таблица 3.5.2, стр. 126). Частота редкого аллеля C=0.002244 для European (non-Finnish) по данным базы GnomAD. Данная замена находится в высококонсервативном динуклеотиде донорного сайта сплайсинга, что приводит к альтернативному сплайсингу и нарушению функции белка [344]. В исследовании A.B. Jorgensen и соавт., 2014 была показана ассоциация варианта IVS2 + 1G>A с низким уровнем триглицеридов и низким риском развития ИБС. В нашем исследовании вариант IVS2 + 1G>A гена *APOC3* определен у пациентки P59 65 лет с гиперхолестеринемией (ОХС 8,2 ммоль/л, ХС-ЛНП 5,45 ммоль/л) и нормальными значениями триглицеридов (0,7 ммоль/л) и ХС-ЛВП (2,4 ммоль/л), DLCN – 5 баллов. В базе данных ClinVar вариант rs138326449 указан как патогенный для состояния дефицит аполипопротеина С-III.

При анализе результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования в гене *LPL* выявлен редкий вариант rs118204077 (NM_000237; p.Arg270Cys, c.808C>T) в гетерозиготной форме (таблица 3.5.2, стр. 126). Частота редкого аллеля C=0.0001 для European (non-Finnish) по данным базы GnomAD [290]. Клиническое значение по данным базы ClinVar [299] указано как патогенное. Rs118204077 известный патогенный вариант HGMD ID CM941054. При анализе с использованием PolyPhen-2 [288] для варианта rs118204077 показана вероятность повреждающего действия на белковый продукт соответствующая score 1.000. Вариант rs118204077 в гене *LPL* был определен у пациента P9 45 лет с гиперхолестеринемией (12,4 ммоль/л) и гипертриглицеридемией (17,4 ммоль/л), DLCN – 5 баллов. Ранее по данным литературы в данном локусе были описаны варианты, ассоциированные с развитием гипертриглицеридемии [345, 346].

У пробанда P83 и сына пробанда P84 с клиникой семейной гиперхолестеринемии определен редкий вариант rs115855236 (chr17:17820281) гена *SREBF1*. Частота редкого аллеля A=0.001210 для European (non-Finnish) по данным базы GnomAD (таблица 3.5.2, стр. 126). В других генах, ассоциированных с СГХС, патогенных и вероятно патогенных вариантов у данных пациентов не

выявлено. Ген *SREBF1*, кодирует основной фактор транскрипции спираль-петля-спираль-лейциновая застежка-молния (bHLH-Zip), который связывается с регуляторным элементом стирола (SRE1) и регулирует биосинтез жирных кислот и холестерина. Одним из генов мишеней для фактора транскрипции SREBF1 является ген *LDLR*.

3.5.10 Результаты полногеномного секвенирования ДНК в группе пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии

По результатам выполненных молекулярно-генетических исследований 52,5% пациентов из группы с фенотипом семейной гиперхолестеринемии не являлись носителями патогенных вариантов в изученных генах липидного обмена. Из данных пациентов с использованием алгоритма машинного обучения были выбраны пять человек с наиболее тяжелым течением СГХС для полногеномного секвенирования. В результате у трех пациентов было выявлено четыре варианта в генах, ассоциированных с липидным метаболизмом, имеющих частоту редкого аллеля менее 0.01%. Среди них два варианта являлись однонуклеотидными делециями, один затрагивал акцепторный сайт сплайсинга и один был миссенс вариантом. Результаты представлены в таблице 3.5.4.

Таблица 3.5.4 – Редкие варианты, определенные у пациентов с фенотипом СГХС в генах липидного обмена при полногеномном секвенировании

Ген	Положение GRCh38/hg38	Положение в кДНК (номер транскрипта)	Аминокислотная замены (Номер белковой последовательности)	Частота минорного аллеля, gnomAD	dbSNP ID
<i>SIDT1</i>	chr3:113627646 GT>G	(NM_017699.3) c.2426del	(NP_060169.2) p.Leu809CysfsTer2	-	Новый
<i>LRP1B</i>	chr2:140442605 G>C	(NM_018557.3) c.10313C>G	(NP_061027.2) p.Pro3438Arg	-	Новый
<i>PLD1</i>	chr3:171645024 G>A	(NM_002662.5) c.2430, -1G>A	-	0.00001768	rs760657350
<i>CETP</i>	chr16:56963054 GC>G	(NM_000078.3) c.165del	(NP_000069.2) p.Ser56AlafsTer11	0.00001415	rs753876598

В гене *SIDT1*, кодирующем трансмембранный белок 1 семейства SID1, определен новый ранее не описанный вариант, который приводит к сдвигу рамки считывания, начиная с кодона 809 (NM_017699.3:c.2426de, NP_060169.2:p.Leu809CysfsTer2).

Ген состоит из 30 экзонов и находится в локусе 3q13.2 хромосомы 3 [347]. Согласно данным gnomAD [290] варианты с потерей функции описаны в этом гене, но ни один из них не был аннотирован как патогенный или вероятно патогенный согласно данным ClinVar [299] и литературы. Для этого гена показан pLI score = 0, что указывает на устойчивость гена к вариантам с потерей функции. По совокупности данных, этот вариант был расценен, как имеющий неопределенную клиническую значимость – критерий патогенности PM2 [291].

Описан новый миссенс-вариант в гене *LRP1B* (LDL receptor related protein 1B) c.10313C>G p.Pro3438Arg в гетерозиготном состоянии. Ген локализован в локусе 2q22.1-q22.2 хромосомы 2, состоит из 92 экзонов и кодирует один из рецепторов семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности [348]. Для этого варианта отсутствуют данные о частоте в GnomAD [290]. Патогенность варианта также подтверждена анализом in silico (Mutation Taster score: 103, CADD score: 33, PolyPhen-2 score: 1.000). Большинство вариантов в этом гене являются доброкачественными (данные ClinVar [299] на 17.02.2023), либо вариантами с неопределенной клинической значимостью. По совокупности данных, вариант был расценен, как вариант с неопределенной клинической значимостью – критерии патогенности PM2, PP3, BP1 [291].

У одного из пациентов определен редкий гетерозиготный вариант в акцепторном сайте сплайсинга (NM_002662.5: c.2430, -1G>A) в гене фосфолипазы D1 (*PLD1*). Вариант зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD: 5 мутантных аллелей на 282768 хромосом (гомозиготы не выявлены). Ген *PLD1* кодирует фосфатидилхолин-специфическую фосфолипазу, которая катализирует гидролиз фосфатидилхолина с образованием фосфатидной кислоты и холина [349]. Ген расположен в локусе 3q26.31 и содержит 35 экзонов. Фосфолипаза D и продукт

ее ферментативной реакции, фосфатидная кислота (РА), регулируют клеточную адгезию иммунных клеток (макрофагов и нейтрофилов) к коллагену [350]. Известно, что биаллельные варианты с потерей функции гена *PLD1* являются причиной врожденных пороков легочного и трехстворчатого клапанов, правого желудочка и выводного тракта правого желудочка сердца и неонатальной кардиомиопатии [351, 352]. По совокупности данных эта замена расценена как носительство вероятно патогенного варианта в отношении врожденных пороков развития сердца – PM2, PVS1 [291]. В отношении СГХС мы отнесли обнаруженную замену к категории вариантов с неизвестной клинической значимостью – критерий патогенности PM2 [291].

У одного из обследованных пациентов выявлена гетерозиготная однонуклеотидная делеция rs753876598, (NM_000078.3: c.165del) в гене *CETP* [121]. Вариант аннотирован в базе данных ClinVar (ID1675625) [299], зарегистрирован в контрольной выборке gnomAD: 4 мутантных аллеля на 282774 хромосом (гомозиготы не найдены) [290]. Известно, что варианты с потерей функции этого гена влияют на уровень ХС-ЛВП [353, 354]. По совокупности критериев оценки патогенности – PM2, PVS1 – данный вариант расценен как вероятно патогенный [291]. Ген *CETP* кодирует белок плазмы, который катализирует обмен триглицеридов и сложных эфиров холестерина между липопротеиновыми частицами [355].

При проведении полногеномного анализа, мы выявили четыре дополнительных варианта в генах, ассоциированных с метаболизмом липидов, удовлетворяющих критериям поиска. Два из этих четырех вариантов ранее были описаны, два являлись новыми. Выявление новых патогенных вариантов позволит улучшить оценку риска развития СГХС и ее осложнений среди пациентов и членов их семей.

Молекулярно-генетические исследования СГХС в России проводятся более 30 лет в разных регионах страны [145]. Наиболее частым ограничением в исследованиях является небольшой размер обследованных выборок. Таргетное секвенирование может быть инструментом не только быстрой и экономичной

диагностики СГХС, но и изучения редких вариантов генов липидного обмена и их влияния на фенотип пациентов [147, 356]. Применение этого метода позволило бы объединить усилия врачей и исследователей различных регионов в изучении СГХС. Использование MLPA необходимо для диагностики СГХС у пациентов без функционально значимых замен в генах, для которых было выполнен один из методов секвенирования [357].

Использование клинических критериев, таргетного секвенирования и MLPA позволяет выявить пациентов – носителей редких патогенных вариантов в широком спектре генов липидного обмена и изучить фенотипические особенности СГХС.

Среди обследованных пациентов (г. Новосибирск, Западная Сибирь) продемонстрировано преобладание гетерозиготной формы СГХС, обусловленной в 73% случаев редкими вариантами в гене *LDLR*. Выявлены два новых варианта NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S и NM_000527:exon8:c.T1123G: p.Y375D в гене *LDLR*. Выявлены 2 крупные делеции NM_000527.4:c.(67+1_68-1)_(1586+1_1587-1)del и NM_000527.4: c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del в гене *LDLR*. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией выявлены редкие «вероятно патогенные» варианты в генах *LPL*, *SREBF2*, *APOC3*, *ABCG5*. У пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии при выполнении полногеномного секвенирования ДНК впервые определены следующие редкие варианты: гетерозиготный вариант (rs760657350), локализованный в акцепторном сайте сплайсинга гена *PLD1*: c.2430-1G>A, ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: c.2426del (p.Leu809CysfsTer2), новый миссенс-вариант c.10313C>G (p.Pro3438Arg) гена *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: c.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*.

3.6 Анализ генов липидного обмена у пациентов с коронарным атеросклерозом с использованием методов высокопроизводительного секвенирования

3.6.1 Полноэкзомное секвенирование ДНК пациентов с коронарным атеросклерозом

Выполнен анализ спектра вариантов в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *LIPA*, *STAP1*, *PNPLA5* и генах *ABCA1*, *APOA1*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* у пациентов с коронарным атеросклерозом методом полноэкзомного секвенирования.

Из 30 пациентов нестабильные атеросклеротические бляшки при гистологическом исследовании определены у 11 человек, стабильные атеросклеротические бляшки при гистологическом исследовании – у 13 человек, стабильные и нестабильные бляшки при гистологическом исследовании – у 6 человек.

В гене *LDLR* выявлен вариант rs774600508 A>G (NP_000518.1:p.His203Arg) в гетерозиготной форме у пациента (P_ka01) с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных сосудах по данным гистологического исследования (таблица 3.61).

Аллель G=0.000020 варианта rs774600508 относится к редким по данным базы gnomAD (5/251054, exome). Данные о клинической значимости в ClinVar отсутствуют. При использовании MutationTester показано, что вариант может быть патогенетически значимым (Prediction disease causing, Model: simple_aae, prob: 0.9998764698083), в то время как по данным PolyPhen-2 вариант отнесен к доброкачественным (benign with a score of 0.001 (sensitivity: 0.99; specificity: 0.15)).

Вариант rs774600508 может представлять интерес для дальнейшего изучения его клинической значимости.

Таблица 3.6.1 – Спектр вариантов в гене *LDLR* у пациентов с коронарным атеросклерозом

Хромосома	Позиция	Референс	Замена	Номер в последовательности	Локализация
chr19	11216190	A	G	rs774600508	экзон
chr19	11212903	A	delA	.	интрон
chr19	11244187	-	TA	.	3'UTR
chr19	11211077	G	A	rs3745677	интрон
chr19	11212902	-	A	rs746690095	интрон
chr19	11215846	T	C	rs10423288	интрон
chr19	11227554	C	T	rs1799898	экзон
chr19	11202195	C	delC	rs141787760	интрон
chr19	11202306	G	T	rs6511720	интрон
chr19	11210912	C	T	rs2228671	экзон
chr19	11218226	G	A	rs13306513	интрон
chr19	11235077	T	G	rs117373926	интрон
chr19	11242133	G	A	rs3826810	3'UTR
chr19	11238818	C	T	rs145293532	интрон
chr19	11211079	C	T	rs3745678	интрон
chr19	11233777	G	A	rs3786730	интрон
chr19	11212903	A	delA	.	интрон
chr19	11237864	C	G	rs137999989	интрон
chr19	11243422	C	T	rs7254521	3'UTR
chr19	11202195	C	delC	rs141787760	интрон
chr19	11202306	G	T	rs6511720	интрон
chr19	11230720	C	T	rs187762599	интрон
chr19	11244189	-	TATA	.	3'UTR
chr19	11216322	C	A	rs915938958	интрон
chr19	11216365	G	T	rs17242885	интрон
chr19	11244008	G	A	rs72658879	3'UTR
chr19	11244187	-	TA	.	3'UTR
chr19	11202195	C	delC	rs141787760	интрон
chr19	11202306	G	T	rs6511720	интрон
chr19	11207745	TT	deTT	rs756137725	интрон
chr19	11207777	C	T	rs117423069	интрон
chr19	11210314	G	A	rs17248783	интрон
chr19	11212941	A	C	rs116530815	интрон
chr19	11217096	C	T	rs537582537	интрон
chr19	11244189	-	TATA	.	3'UTR
chr19	11230690	C	G	rs116959285	интрон
chr19	11243422	C	T	rs7254521	3'UTR
chr19	11244189	-	TATA	.	3'UTR
chr19	11201194	G	C	.	интрон
chr19	11212903	A	delA	.	интрон
chr19	11243422	C	T	rs7254521	3'UTR
chr19	11211077	G	A	rs3745677	интрон

У пациента (P_ka01) также определено носительство $\epsilon 2$ аллеля гена *APOE*. Генотипы, содержащие $\epsilon 2$ аллель, ассоциированы с более низкими уровнями общего холестерина сыворотки и холестерина липопротеинов низкой плотности и более высоким уровнем триглицеридов [107]. У носителей варианта $\epsilon 2$ возможно развитие гиперлипидемии III типа при наличии дополнительных факторов риска ССЗ [120].

У двух неродственных пациентов (P_ka02 и P_ka28) с наличием в коронарных сосудах как стабильных, так и нестабильных бляшек по данным гистологического исследования, выявлен вариант rs5110 (NC_000011.9:g.116691634C>A) гена *APOA5*. Частота аллеля A=0.05 по данным gnomAD. Ассоциация варианта rs5110 (Gly360Thr) с метаболическим синдромом была показана в исследовании случай/контроль [358].

Других, редких патогенных и вероятно патогенных вариантов в генах липидного метаболизма, индексируемых в базах данных HGMD или ClinVar у пациентов с коронарным атеросклерозом не выявлено (таблица A1 в Приложении A).

3.6.2 Полногеномное секвенирование РНК стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа

Метод полногеномного секвенирования РНК (RNA-seq) позволяет идентифицировать полный набор транскрипционных единиц (малые РНК, мРНК, рРНК, тРНК, некодирующие РНК) и продукты их альтернативного сплайсинга (тканеспецифические транскрипты), которые экспрессируются при определенных условиях в разных клетках или тканях. В представленной работе мы использовали метод RNA-seq для проведения исследования транскриптомов двух типов бляшек – стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа.

После проведения гистологического исследования и определения типов бляшек было выполнено полногеномное секвенирование РНК для двух образцов атеросклеротических бляшек в двух повторах: стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа. Пациенты для включения в исследование транскриптома были выбраны по следующим критериям: оба пациента мужского пола, близкого возраста (61 год и 64 года); диагноз (Ишемическая болезнь сердца. Стенокардия напряжения III функциональный класс. ПИКС. ХСН IIА ст. ФК III (NYHA)); во всех трех образцах атеросклеротических бляшек, полученных от каждого пациента, тип бляшек был однороден для каждого из пациентов по результатам гистологического исследования.

Было проведено транскриптомное профилирование двух типов бляшек – стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа – у двух неродственных пациентов, с последующим анализом дифференциально экспрессирующихся генов. Результаты исследования представлены в таблице 3.6.2.

Пациент 1 (61 год) – стабильные атеросклеротические бляшки фиброзного типа в трех образцах коронарных сосудов. По результатам гистологического исследования образцы представлены резко стенозирующими просвет сосуда бляшками (70-75%) из плотной соединительной ткани, состоящей из коллагеновых и эластических пучков волокон, с крупным формирующимся кальцификатом. Без клеточной активности. Стадия фиброза и кальциноза.

Пациент 2 (64 года) – нестабильные атеросклеротические бляшки дистрофически-некротического типа в трех образцах коронарных сосудов. По результатам гистологического исследования образцы представлены резко стенозирующими просвет сосуда бляшками (70-80%), с участками рыхлой и плотной фиброзной ткани с очаговыми некрозами и отложениями солей кальция, содержащими небольшие ядра из аморфных масс и пенистых клеток с умеренной мононуклеарной инфильтрацией. Толстая покрышка представлена плотной

фиброзной тканью с разрывами. Интима сосуда умеренно утолщена за счет плотной фиброзной ткани с инфильтрацией пенистыми клетками и плотно соединена с покрышкой бляшки.

В результате анализа дифференциальной экспрессии генов методом полногеномного секвенирования РНК определены транскрипты генов со статистически значимыми различиями экспрессии в разных типах атеросклеротических бляшках у пациентов с коронарным атеросклерозом. В результате исследования были получены данные по 208 различным транскриптам, 40% из которых были изоформами известных генов. Различия в дифференциальной экспрессии показаны для генов: аполипопротеинов, белков воспалительного цикла, металлопротеиназ, трансмембранных гликопротеинов. Определены гены с максимальной активностью в нестабильных атеросклеротических бляшках: *MAFF*, *ATF3*, *HMGB3*, *HSPA5*, *ZFP36*, *MMP9*. Определены общие патогенные пути с измененной экспрессией генов в нестабильных атеросклеротических бляшках: гипоксии, окислительного стресса, хемокинов, актинового цитоскелета, внеклеточного матрикса.

При анализе активности генов липидного метаболизма статистически значимые различия в экспрессии между типами бляшек были отмечены в генах *LDLR*, *APOB*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *ABCA1*, *APOA1*, *APOE*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*. Результаты исследования представлены в таблице 3.6.2.

Наблюдалось 8-ми кратное статистически значимое увеличение экспрессии *APOE* ($p < 0,0001$) в нестабильных атеросклеротических бляшках дистрофически-некротического типа.

Для нестабильных атеросклеротических бляшек дистрофически-некротического типа также было отмечено увеличение экспрессии генов *ABCA1*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1* и *STAP1*.

Таблица 3.6.2 – Экспрессия генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках

Идентификационный номер	Ген	САБ тп1	САБ тп2	НАБ тп1	НАБ тп2	Степень количественного изменения log2FoldChange	Уровень значимости и p value
NM_005502	<i>ABCA1</i>	294,5	279,0	913,6	888,9	1,647393201	3,89E-53
NM_022436	<i>ABCG5</i>	5,8	4,3	3,4	4,1	-0,312573199	0,71717578
NM_022437	<i>ABCG8</i>	1,4	1,4	0,0	0,0	-1,011003757	0,25306836
NM_000384	<i>APOB</i>	26,0	21,6	6,9	8,3	-1,514048911	0,0060131
NM_000040	<i>APOC3</i>	0,0	0,0	0,0	1,4	0,380698431	0,5732672
NM_001302689	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6928,0	6972,9	4,238955475	0,000000001
NM_001302690	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6927,3	6972,9	4,23888385	0,000000001
NM_000041	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_001302691	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_001302688	<i>APOE</i>	365,3	368,1	6937,6	6981,9	4,240885685	0,000000001
NM_000078	<i>CETP</i>	10,1	11,5	14,5	18,6	0,558494786	0,3394412
NM_001286085	<i>CETP</i>	10,1	11,5	14,5	18,6	0,558494786	0,3394412
NM_001252597	<i>CLPS</i>	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,6321414
NM_001252598	<i>CLPS</i>	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,6321414
NM_001832	<i>CLPS</i>	0,0	0,0	0,0	0,7	0,30093549	0,6321414
NM_000780	<i>CYP7A1</i>	1,4	1,4	0,0	3,5	0,12098096	0,9045035
NM_001195803	<i>LDLR</i>	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_000527	<i>LDLR</i>	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195798	<i>LDLR</i>	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195800	<i>LDLR</i>	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_001195799	<i>LDLR</i>	1621,4	1615,0	621,9	594,2	-1,410434648	5,04E-92
NM_015627	<i>LDLRAP1</i>	223,8	221,5	133,8	146,3	-0,663898859	0,00013271

Продолжение таблицы 3.6.2

Идентификационный номер	Ген	САБ тп1	САБ тп2	НАБ тп1	НАБ тп2	Степень количественного изменения log2FoldChange	Уровень значимости и p value
NM_001288979	<i>LIPA</i>	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_000235	<i>LIPA</i>	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_001127605	<i>LIPA</i>	135,7	142,4	932,9	946,8	2,74490548	2,86E-95
NM_000237	<i>LPL</i>	18,8	21,6	122,7	121,5	2,521350346	9,78E-14
NM_138814	<i>PNPLA5</i>	1,4	1,4	1,4	0,7	-0,210980891	0,8334267
NM_001177675	<i>PNPLA5</i>	1,4	1,4	1,4	0,7	-0,210980891	0,8334267
NM_005505	<i>SCARB1</i>	70,7	77,7	208,2	211,9	1,484062372	3,89E-12
NM_001082959	<i>SCARB1</i>	70,7	77,7	208,2	211,9	1,484062372	3,89E-12
NR_103834	<i>SREBF2</i>	616,5	589,6	417,1	407,9	-0,546434713	1,42E-07
NM_004599	<i>SREBF2</i>	616,5	589,6	417,1	407,9	-0,546434713	1,42E-07
NM_012108	<i>STAP1</i>	2,9	2,9	25,5	23,5	2,616230491	0,0001969

Примечание: НАБ - нестабильные атеросклеротические бляшки дистрофически-некротического типа

САБ - стабильные атеросклеротические бляшки фиброзного типа

тп1, тп2 – технические повторы

В стабильных атеросклеротических бляшках наблюдалось 8-ми кратное статистически значимое увеличение экспрессии генов *LDLR* и *APOB* ($p < 0,0001$), а также повышенная экспрессия генов *LDLRAP1* и *SREBF2*.

Не было получено статистически значимых различий в активности генов *ABCG5*, *ABCG8*, *APOC3*, *CETP*, *CLPS*, *CYP7A1* и *PNPLA5*.

На следующем этапе был выполнен анализ дифференциальной экспрессии генов между полученными нами образцами атеросклеротических бляшек и тканями интактных коронарных сосудов из базы данных GEO (Gene Expression Omnibus, NCBI). База данных Gene Expression Omnibus (GEO) – международное общедоступное хранилище, архивирующее и свободно распространяющее высокопроизводительные наборы данных экспрессии генов [359].

Образцы для анализа были стандартизованы по полу, возрасту, этнической принадлежности (европеоиды, non-Finnish). Для выявления транскриптов генов со статистически значимыми различиями в экспрессии между типами бляшек, использовали $FDR < 0.05$, более чем 8-кратные различия ($-3 < \log_2 \text{fold_change} < +3$). Были определены различия в экспрессии более 190 генов между тканями атеросклеротических бляшек и тканями интактных коронарных сосудов. В том числе были выявлены статистически значимые различия в активности генов апополипротеинов С1 и Е (таблица 3.6.3).

Таблица 3.6.3 – Экспрессия генов апополипротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках и в тканях интактных коронарных сосудов

Ген	Локус	Экспрессия в интактных коронарных сосудах	Экспрессия в атеросклеротических бляшках	Степень количественного изменения $\log_2 \text{fold_change}$	Уровень значимости p_value
<i>APOC1</i>	19:44905753 -44919349	2,13079	568,754	8,06027	0,0015
<i>APOE</i>	19:44905753 -44919349	75,1808	870,865	3,53401	0,0007

Полученные нами данные о дифференциальной экспрессии генов апополипротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках согласуются с ранее опубликованными результатами Sulkava, M. et al. [272]: в которых были показаны, несколько семейств генов, связанных с транспортом липидов, с максимальными различиями экспрессии в атеросклеротических бляшках. Активность апополипротеина D была снижена во всех исследованных артериальных руслах, в то время как экспрессия апополипротеина Е и апополипротеина С1 значительно

повышалась в атеросклеротических бляшках. Аполипопротеин C1 был особенно активирован в каротидных бляшках.

Аполипопротеин D образует макромолекулярный комплекс с лецитин-холестериновой ацилтрансферазой [272]. APOD участвует в процессах транспортировки, в том числе, совместно с аполипопротеином A1 действует в качестве кофактора для лецитин-холестериновой ацилтрансферазы.

Совокупность эпигеномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных исследований по-прежнему актуальна для формирования сетей сигнальной трансдукции у человека [267, 268]. Современные методы диагностики позволяют оценить степень распространения атеросклеротического повреждения и локализацию отдельных бляшек, но не могут прогнозировать ее поведение. Развитие и прогрессирование атеросклеротического процесса сопровождается появлением серии белковых медиаторов воспаления и значительной активностью хемотаксиса [360]. Детекция предшествующих белкам транскриптов является более информативным показателем изменений при патологических процессах и позволяет оценить степень выраженности заболевания до возникновения его фенотипических проявлений (детектируемые белковые продукты, продукты метаболизма, пептиды).

Полученные нами результаты еще раз показывают сложность ранней визуализации и диагностики дестабилизирующих процессов в атеросклеротической бляшке. Использование технологий высокопроизводительного секвенирования позволяет получить новую информацию о вариабельности структуры генов липидного обмена в популяционных группах и в клинических группах лиц с гиперхолестеринемией и заболеваниями атеросклеротического генеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для России актуально развитие исследований в области изучения генетики распространенных заболеваний человека с использованием современных высокопроизводительных технологий и репликации наиболее важных ассоциативных исследований. Это обусловлено необходимостью анализа популяционной специфичности вклада генетических факторов в формирование предрасположенности к распространенным заболеваниям человека в условиях влияния средовых факторов, характерных для популяций России. Мировая медицинская наука накапливает все больше данных, свидетельствующих о возможности выраженной популяционной и этнической специфичности этиологии и патогенеза распространенных заболеваний. В связи с этим важным направлением анализа генетических детерминант распространенных заболеваний человека является проверка информативности генетических маркеров, отобранных в ходе полногеномного анализа, как в популяциях России, так и в других странах. Формирование корректных по дизайну в эпидемиологическом отношении выборок, позволяет детектировать минимальные вклады генетических факторов в формирование повышенного риска развития атерогенных форм дислипидемии [4, 5, 361, 362].

Частота редких аллелей для изученных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LDLR*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* составила: rs2230806 – 26%, rs2066718 – 12%, rs670 – 27%, rs5742904 – 0,7%, rs1042023 – 1,7%, rs5128 – 10,5%, ε2 – 9,0%, ε4 – 11,0% (rs429358 и rs7412), rs708272 – 46,8%, rs2766597 – 0,4%, rs320 – 26,8%, rs5888 – 43,3% и rs2228314 – 29,5%, соответственно. Данные варианты не являются определяющими в высокой распространенности сердечно-сосудистых заболеваний в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири.

Европеоидная популяция Западной Сибири по частоте аллелей и генотипов сопоставима с такими странами, как Франция, Италия, Чехия, Польша, но в отличие от этих стран, частота распространенности сердечно-сосудистых

заболеваний в Западной Сибири выше [363]. Возможно, это объясняется совокупностью действия среды (питание, физическая активность, курение, распространенность инфекционных заболеваний, климатические условия) и особенностями фенотипических проявлений генетических нарушений, в том числе в генах липидного метаболизма.

Несмотря на то, что в исследовании не выявлены статистически значимые отличия в частоте аллелей и генотипов изученных вариантов в европеоидной популяции Западной Сибири в сравнении с европеоидными популяциями Центральной и Восточной Европы, экстраполировать результаты исследований, полученных на других популяциях, необходимо с предварительным анализом популяционной специфичности для каждого отдельного региона.

В результате проведенного исследования в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири на примере г. Новосибирска при сопоставлении с популяциями различных регионов мира распространенность аллелей и генотипов полиморфизма гена *APOE* близка к наблюдаемой в европеоидных популяциях Центральной и Восточной Европы. Распределение частоты аллеля $\epsilon 4$ в различных этнических группах сформировано, по-видимому, механизмами адаптации к условиям внешней среды. По данным Fullerton S. et al. 2000, аллель $\epsilon 4$ является наиболее ранним эволюционным вариантом [364]. Популяции, сохраняющие до последнего времени традиционный уклад жизни охотников-собирателей и обладающие более высокой частотой $\epsilon 4$ обладают оптимальным адаптационным потенциалом в условиях нерегулярного поступления пищевых продуктов. В популяциях с современным типом питания и регулярным поступлением пищевых продуктов наблюдается более высокая частота аллеля $\epsilon 2$, эволюционно наиболее молодого варианта полиморфизма кодирующей части гена *APOE*. Существует предположение, что распространение данного аллеля коррелирует с возникновением первичных центров земледелия в мире [74].

Анализ популяционной и этнической специфичности вариабельности ДНК позволяет изучить закономерности и особенности развития патологических процессов для популяций, проживающих в существенно различающихся условиях.

При отсутствии статистически значимых отличий распространённости изученных вариантов в европеоидной популяции Западной Сибири в сравнении с европеоидными популяциями Центральной и Восточной Европы сохраняются различия с популяциями Северной и Южной Европы и с популяциями коренных народов Севера и Юга Сибири [74].

Впервые полное секвенирование кодирующей части гена *LDLR* выполнено не только для пациентов с семейной гиперхолестеринемией, но для популяционной выборки случаев гиперхолестеринемии и у лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина сыворотки в популяционной группе 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири.

В выборке лиц из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири, дифференцированных только по уровню общего холестерина сыворотки, выявлены редкие «вероятно патогенные» варианты в гене *LDLR*: rs2077408020, rs768563000, rs121908040, rs137929307, rs1225797407. Молекулярно-генетические методы являются наиболее перспективными и доступными для диагностики функционально значимых нарушений структуры гена *LDLR*. В ряде случаев, когда недоступно использование клинических критериев DLCN (уровень ХС-ЛНП, семейный анамнез и т.д.), наличие у пациента семейной гиперхолестеринемии можно предположить по крайне высокому уровню ОХС и направить пациента на проведение молекулярно-генетического исследования. Использование дифференциации по уровню ОХС также применимо для ретроспективных исследований, т.к. этот показатель часто определяется при заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Не выявлено редких патогенных вариантов у лиц с низкими и нормальными уровнями общего холестерина сыворотки. Обследованные лица с нормальными и низкими уровнями ОХС отличаются от группы пациентов с семейной гиперхолестеринемией по спектру вариантов в гене *LDLR*. Определенные варианты представлены синонимичными заменами и интронными доброкачественными вариантами.

На материале популяционной группы 45-69 лет европеоидного населения Западной Сибири выполнены ассоциативные исследования однонуклеотидных вариантов генов *APOE*, *CETP*, *LPL* и *SCARB1* с рядом биохимических показателей: ОХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ и индексом атерогенности.

В исследовании показана статистически значимая ассоциация между генотипами варианта rs429358 и rs7412 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) кодирующей части гена *APOE* и некоторыми факторами риска атеросклероза у обследованных лиц популяционной группы.

Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов были статистически значимы ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$. Минимальные значения среднего уровня ОХС определяются при генотипе $\epsilon 2/\epsilon 3$, статистически значимые при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 2/\epsilon 2$ ($p=0,002$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,002$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$).

Различия в средних уровнях ХС-ЛНП у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня ХС-ЛНП выявлено для генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$. Минимальные значения среднего уровня ХС-ЛНП определяются при генотипе $\epsilon 2/\epsilon 3$, статистически значимые при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,0001$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). В популяционной группе выявлено повышение средних уровней ХС-ЛНП для генотипов, содержащих аллель $\epsilon 4$, повышение среднего уровня триглицеридов в случае генотипов, содержащих аллель $\epsilon 2$ и максимальный индекс атерогенности для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$. Подобный характер ассоциации уровней липидов крови с изученным полиморфизмом ранее был отмечен для ряда популяций в исследованиях [107, 322, 323]. Выявленная ассоциация варианта гена *APOE* с факторами риска развития атеросклероза подтверждает перспективность изучения данных генотипирования для оценки индивидуального риска развития атеросклероза.

Носительство генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$ гена *APOE* является обязательным, но недостаточным условием развития гиперлипидемии III типа [120]. Выявлены популяционные особенности формирования дислипидемии в европеоидной

популяции Западной Сибири, характеризующиеся ассоциацией не липидных факторов риска развития ССЗ с полиморфизмом генов липидного метаболизма. Различия в средних уровнях глюкозы крови у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,01$). Максимальное значение среднего уровня глюкозы крови выявлено для генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$, статистически значимое при попарном сравнении с генотипами $\epsilon 2/\epsilon 3$ ($p=0,006$), $\epsilon 3/\epsilon 3$ ($p=0,009$) и $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,005$). Носители гомозиготного генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$ в популяционной группе составляют 1,7%, у обследованных лиц с ОХС выше 7 ммоль/д – 2,8%. Нарушения углеводного обмена играют важную роль в развитии ГЛП III и подтверждают перспективность изучения модифицирующей роли метаболических нарушений, с учетом структурных изменений генов, в развитии атерогенных форм дислипидемии.

Выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами варианта rs708272 гена *CETP* и уровнями ХС-ЛВП ($p=0,0001$). Ранее была показана статистически значимая ассоциация между генотипами полиморфизма TaqI B (rs708272) гена *CETP* и ХС-ЛВП в группах, контрастных по среднему уровню ОХС [365]. Было выявлено повышение уровня ХС-ЛВП для B2B2 (GG) генотипа в группе пациентов с гиперхолестеринемией. Это подчеркивает важность проведения не только популяционных исследований, но и изучения лиц со специфическими фенотипами липидного профиля, для определения вклада генетических факторов в формирование предрасположенности к распространенным заболеваниям. В работе Gilberto Vargas-Alarcon и соавт., была показана ассоциация аллеля G с пониженной концентрацией ХС-ЛВП и повышенным риском острого коронарного синдрома (ОШ = 1.45, $p = 0.036$) [129]. В 2016 г. Guo и соавторами на основании мета-анализа было установлена ассоциация между генотипом AA и более высоким уровнем ХС-ЛВП в сравнении с лицами с генотипом GG ($p<0.001$), а также повышенным риском сердечно-сосудистых событий у носителей аллеля G (ОШ = 1.15, $p<0.001$) у представителей, как азиатской, так и европеоидной популяции [128].

Проведенный нами анализ подтверждает перспективность изучения ассоциаций полиморфизма генов с факторами риска ССЗ для изучения и оценки индивидуального риска развития атеросклероза с учетом имеющегося мирового опыта.

Генотип GG варианта rs320 гена *LPL* статистически значимо не ассоциирован с показателями липидного профиля крови в европеоидной популяционной группе Западной Сибири. Различия в средних уровнях показателей липидного профиля крови и индекса атерогенности у носителей разных генотипов варианта rs5888 гена *SCARB1* были статистически не значимы. В отличие от данных других исследований, показавших ассоциацию аллеля T rs5888 низким риском ишемической болезни сердца [169] и низкими уровнями триглицеридов в плазме, особенно у мужчин [170]. Варианты rs320 гена *LPL* и rs5888 гена *SCARB1* не являются определяющими детерминантами гиперхолестеринемии в популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири.

Знание механизмов нарушения липидного обмена позволяет диагностировать доклинические стадии атеросклеротического процесса, проводить направленную коррекцию липидного обмена и мотивировать пациентов на модификацию образа жизни.

Существование нескольких генетических детерминант размера частиц ЛНП, было подтверждено в исследовании Daniel Chasman с соавторами, опубликованном в 2009 г. [366]. При проведении полногеномного анализа ассоциаций (genome-wide association study – GWAS) выявлено 43 локуса, ассоциированные с размером, концентрацией и содержанием холестерина в частицах липопротеинов плазмы. Выявлено 10 новых локусов, ассоциированных с размерами частиц ЛНП, а также ранее изученные локусы, подтвердившие ассоциацию с формированием субфракций ЛНП, в том числе и с вариантом rs320 гена *LPL*, включенным в данное исследование [366]. Выявлена ассоциация варианта rs320 гена *LPL* с минорным пиком частиц на нисходящей кривой субфракционного профиля ЛНП ($p=0,02$). Согласно современным представлениям, существует несколько механизмов образования промежуточных фракций ЛНП. В результате действия

липопротеинлипазы на поверхности сосудистого эндотелия происходит гидролиз триглицеридов липопротеинов очень низкой плотности. Последние превращаются вначале в меньшие по размеру и обогащенные холестерином липопротеины промежуточной плотности, а затем в ЛНП, богатые холестерином [184, 327]. Мелкие частицы ЛОНП содержат мало апоЕ (1-2 молекулы на частицу), медленно элиминируются этим рецепторным путем, длительно циркулируют в крови, подвергаясь процессам липолитической деградации, и, в конечном счете, превращаются в субфракции ЛНП [328, 329]. С другой стороны, Fisher R.M. и соавторы (1995) при исследовании чувствительности ТГ-богатых субфракций ЛОНП к гидролизу ЛПЛ *in vitro* выявили, что ЛПЛ действует преимущественно на большие частицы ЛОНП. Большой размер и повышенное содержание ТГ в частицах ЛОНП приводят к повышению их чувствительности к гидролизу ЛПЛ [330].

Таким образом, при снижении активности ЛПЛ, снижается образование мелких плотных частиц, богатых холестерином и повышается содержание частиц, богатых ТГ, что может приводить к развитию комбинированной дислипидемии с высокими уровнями ОХС и ТГ.

Впервые выполнено таргетное высокопроизводительное секвенирование и изучен спектр редких вариантов 43 генов, включая *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, у лиц семейной гиперхолестеринемией в Западной Сибири. Получены данные таргетного высокотехнологичного секвенирования ДНК. В исследование включены 80 пациентов, направленных врачом-липидологом на молекулярно-генетическое исследование, с диагнозом семейная гиперхолестеринемия. Диагноз СГХС был поставлен с использованием клинических липидных критериев Dutch Lipid Clinic Network Criteria (Geneva: World Health Organization) [280].

Для расчета баллов согласно критериям DLCN было использовано программное обеспечение «Калькулятор СГХС», разработанный на кафедре Автоматики факультета Автоматики и вычислительной техники «Новосибирского государственного технического университета» [367]. Вероятность наличия у пациента СГХС установлена на основании суммы баллов, полученных в каждой

группе критериев. Для анализа ХС-ЛНП родственников первой степени родства с известным уровнем ХС-ЛНП > 95 перцентилиа по возрасту и полу в программном обеспечении использованы данные популяционных показателей ХС-ЛНП в зависимости от пола и возраста для России [191]. В соответствии с набранной суммой баллов семейная гиперхолестеринемия определялась как «определенная», «вероятная» или «возможная».

Таргетная панель разработана для 43 генов (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *CETP*, *LPL*, *HMGCR*, *NPC1L1*, *PPARA*, *MTTP*, *LMF1*, *SAR1B*, *ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5*, *APOA1*, *APOA5*, *APOC2*, *APOE*, *LCAT*, *ANGPTL3*, *LIPC*, *APOA4*, *APOC3*, *SREBF1*, *LMNA*, *PPARG*, *PLIN1*, *POLD1*, *LPA*, *SMAD1*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD5*, *SMAD6*, *SMAD7*, *SMAD9*, *LIPG*).

Гены *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* ассоциированы с аутосомно-доминантной формой СГХС; гены *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1* ассоциированы с аутосомно-рецессивной формой СГХС; гены *STAP1*, *LIPA*, *PNPLA5* ассоциированы с вариациями фенотипа СГХС, включая развитие гипертриглицеридемии; редкие варианты в генах аполипопротеинов и других генах липидного обмена могут быть причиной развития у пациентов фенотипа подобного СГХС.

У пациентов с семейной гиперхолестеринемией средние значения ОХС составили $8,6 \pm 3,4$ ммоль/л, максимальный уровень 25 ммоль/л. Относительно невысокий уровень ОХС обусловлен тем, что на момент первичного осмотра врачом-липидологом Клинико-диагностического центра НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН препараты, снижающие уровень липидов, принимали 41 % пробандов. Все липид снижающие препараты относились к группе статинов. У одного пробанда была непереносимость липид снижающих препаратов группы статинов. По данным осмотра – у 42% обследованных с СГХС определяются ксантомы сухожилий. У трех пробандов (4,9 %) был сопутствующий диагноз СД2.

Редкие «патогенные» и «вероятно патогенные» варианты в генах, ассоциированных СГХС, определены у 47,5% обследованных лиц. У 19 пробандов (73,1 % от всех выявленных у пробандов вариантов) определены патогенетически значимые варианты в гене *LDLR*, у трех пробандов (11,5 %) определены

патогенные варианты в гене *APOB* и у четырех пробандов выявлены редкие, патогенетически значимые варианты в генах *LPL*, *SREBF1*, *APOC3*, *ABCG5* (15,4 %). У 12 из 14 детей пробандов (85,7%) выявлены патогенетически значимые варианты в генах, ассоциированных с СГХС: в 10 случаях в гене *LDLR*, в одном случае в гене *APOB* и в одном случае в гене *SREBPF1*. Из 6 родственников пациентов первой линии родства (мать, отец, родные братья и сестры) в одном случае выявлен патогенный вариант в гене *LDLR*.

Все миссенс варианты в гене *LDLR* представлены в гетерозиготной форме. Ряд выявленных вариантов Cys352Tyr, Cys340Phe и Leu401His был ранее описан у пациентов с СГХС в России [142] и в других странах [332, 333]. Наиболее распространенный вариант – rs121908038 – встречался в трех неродственных семьях.

Нами выявлены два случая носительства компаунд гетерозигот в гене *LDLR* у неродственных пациентов молодого возраста с тяжелой сердечно-сосудистой патологией (ИМ в возрасте до 30 лет у женщин), гиперхолестеринемией более 18 ммоль/л и баллами по DLCN равными 18.

В одном случае: chr19:11217342 и chr19:11221441 в экзонах 5 и 7 гена *LDLR*. Во втором случае были определены редкие варианты в 3 и 8 экзонах гена *LDLR*. Один из вариантов определен в позиции chr19:11213415 (NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S), ранее в этой позиции был описан редкий патогенный вариант rs875989894 с заменой G>A (<https://databases.lovd.nl/shared/variants/0000092111#00011039> от 01.10.2021). Другой вариант локализован в chr19:11222252, он описан впервые: NM_000527:exon8:c.T1123G:p.Y375D.

Представлен клинический случай носительства редкого варианта в регуляторном районе гена *LDLR*. Вариант c.2389+5G>A находится в высококонсервативном динуклеотиде AG донорного сайта сплайсинга интрона 16 гена *LDLR*. Для анализа функциональной значимости обнаруженной замены использовали программу SPANR [337]. Согласно оценке SPANR, изменение вероятности включения экзонов в мРНК в разных тканях при наличии

обнаруженного варианта составило -13.47 баллов, включение экзонов 14-16 в транскрипты гена будет снижено. Ранее rs879255191 была описана у больных СГХС, в том числе в России [338].

Сорока двум пациентам, без функционально–значимых замен в генах липидного метаболизма, был выполнен MLPA анализ для определения структурных изменений (делеции, дупликации) промотора и экзонов гена *LDLR*.

Проведенный анализ выявил делеции в образцах ДНК двух неродственных пациентов. В первом случае делеция NM_000527.4:c.(67+1_68-1)_(1586+1_1587-1)del в гетерозиготной форме затрагивала участок со 2 по 10 экзоны, во втором – пациент являлся носителем делеции 15 экзона гена *LDLR* NM_000527.4:c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del в гетерозиготной форме. Этот метод позволяет обнаруживать вариации числа копий гена и, соответственно, широко используется в молекулярной диагностике заболеваний, патогенез которых связан с делециями или дупликациями определенных участков генома. Более широкое использование метода MLPA позволит дополнительно выявить до 2-3% пробандов с СГХС.

При молекулярно-генетическом исследовании получены данные о наличии ряда структурных изменений в гене *APOB* у пациентов с фенотипом СГХС. У трех пациентов из двух неродственных семей (пробанд и сын пробанда из одной семьи и пробанд из другой семьи) определен вариант rs5742904 NM_000384.3(*APOB*):c.10580G>A (p.Arg3527Gln). В результате вариабельности участка гена *APOB*, кодирующего сайт связывания с рецептором ЛНП, развивается гиперхолестеринемия [340; 341]. Один из вариантов данного участка – rs5742904 – приводит к развитию гиперхолестеринемии со сниженным клиренсом ЛНП вследствие дефекта структуры ЛНП, обеспечивающей сродство с рецептором ЛНП [342].

Редкий вариант rs145164937 в гене *ABCG5* в гетерозиготной форме определен у одного из пробандов. При анализе результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования в гене *APOC3* выявлен вариант rs138326449 (IVS2+1G>A) в гетерозиготной форме. В гене *LPL* выявлен редкий

вариант rs118204077 (p.Arg270Cys, c.808C>T) в гетерозиготной форме. У одного пробанда и сына пробанда с клиникой семейной гиперхолестеринемии определен редкий вариант rs115855236 (chr17:17820281) гена *SREBF1*. Выявленные нами у четырех пробандов редкие варианты в генах *LPL*, *SREBF2*, *APOC3*, *ABCG5* (15,4 %) могут как являться самостоятельной причиной развития СГХС, так и модифицировать ее фенотип.

У пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии при выполнении полногеномного секвенирования ДНК впервые определены следующие редкие варианты: гетерозиготный вариант (rs760657350), локализованный в акцепторном сайте сплайсинга гена *PLD1*: c.2430-1G>A, ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: c.2426del (p.Leu809CysfsTer2), новый миссенс-вариант c.10313C>G (p.Pro3438Arg) гена *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: c.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*.

Один из генов, в которых были найдены редкие варианты у пациентов с СГХС – *PLD1*, кодирующий фермент фосфолипазу D1. Фосфолипаза D1 гидролизует мембранно-липидный фосфатидилхолин с образованием фосфатидной кислоты [352]. Фосфатидная кислота является промежуточным метаболитом в синтезе всех мембранных глицерофосфолипидов и играет важную структурную роль в живых клетках, способствуя биогенезу мембран [368], кроме того, показана ее роль, а также роль фосфолипазы D1 в экзоцитозе [369]. Миссенс варианты в гене *PLD1* сверхпредставлены у человека в областях белка, критических для каталитической активности, что приводит к значительному снижению ферментативной активности большинства мутантных белков [352]. Также на клеточных линиях показано, что повышенная экспрессия *PLD1* увеличивала образование липидных капель, тогда как нокдаун *PLD1* с помощью siRNA ингибировал этот процесс [370]. Выявленный в нашем исследовании вариант (NM_002662.5: c.2430, -1G>A) у пробанда с СГХС и без признаков врожденных пороков сердца, находился в гетерозиготном состоянии. Учитывая низкую частоту распространенности варианта и возможной его роли в субклеточном транспорте и образовании липидных капель, данная замена

интересна для последующего анализа у лиц с нарушениями липидного обмена.

Редкий вариант обнаружен в гене *LRP1B* (Receptor Related Protein 1B, родственный рецептору белок 1). Белок *LRP1B* является членом семейства рецепторов липопротеинов низкой плотности. *LRP1B* играет роль в катаболизме липопротеинов, в связи этим изучение редких вариантов гена *LRP1B* у лиц с СГХС является перспективным. Большинство из недавно идентифицированных лигандов *LRP1B* являются хорошо известными факторами свертывания крови и метаболизма липопротеинов, что предполагает его возможное участие в атеросклеротическом процессе [371].

Для гена *SIDT1* ранее было показано участие в транспорте холестерина [372], но в контексте изучения фенотипа семейной гиперхолестеринемии он не рассматривался. Найденный нами вариант, вероятнее всего, не участвует в формировании клинического фенотипа СГХС, т.к. оценка с помощью критериев ACMG [291] позволяет отнести его к вариантам с неопределенной клинической значимостью, но для однозначной оценки его ассоциации с фенотипом СГХС требуется дополнительные данные.

Ген *CETP* кодирует белок CETP, переносящий эфиры холестерина. Вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: c.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*, может, как и другие варианты в гене *CETP* изменять липидный профиль крови [373]. При построении карты функциональных и физических ассоциаций предсказанным функциональным партнером для белка CETP был белок APOB, мутации в котором являются одной из причин развития СГХС. Для оценки патогенетических эффектов выявленных вариантов в формировании клинического фенотипа СГХС требуется проведение дополнительного сегрегационного и функционального анализа.

Выявление новых патогенных вариантов позволит улучшить оценку риска развития СГХС и ее осложнений среди пациентов и членов их семей.

Отрицательный результат генетического скрининга мутаций гена *LDLR*, *APOB* и *PCSK9* не исключает наличия у пациента СГХС. Примерно в 40% случаев при молекулярно-генетическом исследовании не удастся определить причину

развития СГХС или повышенный уровень ХС-ЛНП может иметь полигенный характер наследования [219, 261].

В данном исследовании частота зарегистрированных «патогенных» и «вероятно патогенных» мутаций составила 47,5% у обследованных пробандов с фенотипом СГХС из региона Западная Сибирь (Россия) и в 85,7% у детей пробандов. Как и в других исследованиях, это подтверждает эффективность применения стратегии каскадного генетического скрининга.

Таким образом, у пациентов с семейной гиперхолестеринемией региона Западной Сибири определены ранее не описанные в литературе и базах данных варианты в гене *LDLR*. Для пациентов с семейной гиперхолестеринемией были выявлены крупные делеции экзонов гена *LDLR* с использованием метода мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб.

Молекулярно-генетические исследования СГХС в России проводятся более 30 лет в разных регионах страны [145]. Наиболее частым ограничением в исследованиях является небольшой размер обследованных выборок. Ограничение размера выборок не позволяет оценить особенности клинического течения заболевания при различных локализациях патогенных вариантов в генах липидного обмена и оценить спектр патогенных вариантов в генах липидного обмена у населения России. Таргетное секвенирование может быть инструментом не только быстрой и экономичной диагностики СГХС, но и изучения редких вариантов генов липидного обмена и их влияния на фенотип пациентов [147]. Применение этого метода позволило бы объединить усилия врачей и исследователей различных регионов в изучении СГХС.

Комплексное использование клинических критериев, таргетного секвенирования и MLPA позволяет выявить максимальное число пациентов – носителей редких патогенных вариантов в широком спектре генов липидного обмена и изучить фенотипические особенности СГХС.

Молекулярно-генетическое исследование гена *PCSK9* должно проводиться для диагностики аутосомно-доминантной СГХС, после или одновременно с исследованием генов *LDLR* и *APOB*. Несмотря на то, что мутации в гене *PCSK9*

являются причиной только 1-3 % СГХС, они могут существенно влиять на вариабельность уровня холестерина и предрасположенность к ИБС.

Открытие причастности вариантов гена *PCSK9* к регулированию уровня ХС-ЛНП и развитию ИБС имеет решающее значение в демонстрации важности продолжительности снижения холестерина для профилактики этого заболевания.

Лица с мутациями потери функции *PCSK9* имеют низкую концентрацию ХС-ЛНП (40 мг/дл и ниже) на протяжении всей жизни, что снижает заболеваемость ИБС на 88 %, в то время как снижения уровня холестерина на 40 мг/дл при лечении статинами в течение 5 лет снижает ИБС лишь на 23 % в среднем. Это наблюдение очень важно, поскольку это показывает, необходимость коррекции ХС-ЛНП задолго до клинических проявлений атеросклероза, чтобы достичь значимого снижения заболеваемости ИБС [206, 207].

Коррекция уровня *PCSK9* в крови является одним из перспективных направлений для лечения гиперхолестеринемии и профилактики развития ИБС [215]. Блокирование взаимодействий между рецепторами к ЛНП и *PCSK9* может привести к снижению сердечно-сосудистого риска у людей с СГ за счет увеличения количества рецепторов к ЛНП и снижения уровня ХС-ЛНП крови [215, 374]. Наиболее перспективным для ингибирования деградации рецепторов к ЛНП является использование моноклональных антител.

Молекулярно-генетическая диагностика важный этап для клинической практики, особенно для семейного скрининга лиц с гиперхолестеринемией. В настоящем исследовании мы анализировали редкие варианты в генах, ассоциированных с развитием СГХС и в генах, ассоциированных с другими нарушениями липидного обмена, сочетая изучение клинических критериев с NGS.

Метод таргетного высокопроизводительного секвенирования эффективно использовался в качестве скринингового теста первой линии для определения редких вариантов в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* и других. Затем идентифицированные варианты были верифицированы прямым автоматическим секвенированием по Сэнгеру с последующим каскадным генетическим скринингом доступных членов семьи.

Среди обследованных пациентов (Западная Сибирь) продемонстрировано преобладание гетерозиготной формы СГХС, обусловленной в 73% случаев редкими вариантами в гене *LDLR*. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией выявлены редкие патогенные и вероятно патогенные варианты в изучаемых генах. Спектр мутаций гена рецептора ЛНП, характеризуется выраженной гетерогенностью и специфичностью для разных этнических групп [298-300], включая миссенс-мутации, сплайсинг мутации и крупные делеции [300]. В настоящее время известно более 1800 мутаций в гене рецептора ЛНП [298].

Использование в клинической практике молекулярно-генетической диагностики семейной гиперхолестеринемии позволяет выявлять заболевание на ранних стадиях, до развития осложнений, связанных с прогрессированием атеросклеротического процесса и назначать пациентам адекватную липидснижающую терапию.

Все семьи, в которых выявлены мутации, ассоциированные с семейной гиперхолестеринемией, должны быть целенаправленно обследованы для определения родственников, которые могут быть в группе риска наличия СГХС. Атеросклеротические бляшки обладают способностью регрессировать в молодом возрасте даже при гомозиготной форме СГХС [375].

Пациенты с семейной гиперхолестеринемией относятся к категориям высокого и очень высокого риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [376]. Утолщение комплекса интима-медиа брахиоцефальных артерий чувствительно к изменениям уровня ХС-ЛНП [16], ассоциировано с повышенным риском ИБС и служит конечной точкой атеросклеротического процесса для терапевтических вмешательств [17].

Высокий уровень ХС-ЛНП с рождения [14] и его кумулятивный эффект у пациентов с СГХС [15, 377-380] играет существенную роль в раннем развитии осложнений атеросклеротического процесса, поэтому особенно важно диагностировать СГХС у пациентов в детском и молодом возрасте [381]. Пациентам молодого возраста должна быть назначена адекватная липидснижающая терапия. Не смотря на применение липидснижающих

препаратов, у пациентов с СГХС сохраняется высокий остаточный риск развития сердечно-сосудистых событий [18].

Молекулярно-генетический диагноз СГХС сегодня является определяющим при назначении пациентам адекватной терапии современными классами липид снижающих препаратов. В 2018 году Familial Hypercholesterolemia Foundation инициировал оценку полезности генетического тестирования СГХС с привлечением группы международных экспертов. Экспертная группа рекомендовала, чтобы генетическое тестирование семейной гиперхолестеринемии стало стандартом оказания помощи пациентам с определенной или вероятной семейной гиперхолестеринемией, а также их родственникам из группы риска [259].

Тестирование должно включать гены, кодирующие рецептор липопротеинов низкой плотности (*LDLR*), аполипопротеин В (*APOB*) и пропротеин-конвертазу субтилизин / кексин 9 (*PCSK9*), анализ других генов также может потребоваться исходя из фенотипа пациента.

Ожидаемые результаты от применения генетического тестирования СГХС включают точность диагностики, эффективность каскадного тестирования у родственников пациентов, начало терапии в более раннем возрасте и точную стратификацию сердечно-сосудистого риска [259]. У пациентов с высоким уровнем ХС-ЛНП и подтвержденной мутацией в одном из вышеназванных генов, ассоциированных с СГХС, показано повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний в 22 раза [260].

Своевременно поставленный диагноз позволяет не только снизить риск развития сердечно-сосудистых заболеваний у пробанда, но и обследовать его родственников с целью диагностики и первичной профилактики ССЗ. Определение наследственной природы заболевания имеет большое значение не только для пациента, но и для членов его семьи, для которых возможна диагностика и профилактическое лечение гиперлипидемии на ранних доклинических стадиях развития патологического процесса.

Атеросклеротическое повреждение сосудов является наиболее частой причиной развития сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Вследствие

формирования атеросклеротических бляшек на стенках сосудов происходит сужение просвета артерии, снижение кровотока, развитие гипоксии и ишемии. В клинической картине атеросклероза важно своевременно диагностировать признаки дестабилизации атеросклеротической бляшки, т.к. нестабильные бляшки подвержены разрыву, что может привести к развитию осложнений (инсульт, инфаркт и т.д.). Актуален поиск и выявление молекулярных факторов, отражающих процессы, связанные с дестабилизацией бляшек, особенно для пациентов с бессимптомным течением заболевания.

Выполнен анализ спектра вариантов в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *LIPA*, *STAP1*, *PNPLA5* и генах *ABCA1*, *APOA1*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* у пациентов с коронарным атеросклерозом методом полноэкзомного секвенирования.

В гене *LDLR* выявлен вариант rs774600508 A>G (NP_000518.1:p.His203Arg) в гетерозиготной форме у пациента с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных сосудах по данным гистологического исследования. Аллель G=0.000020 варианта rs774600508 относится к редким по данным базы gnomAD (5/251054, exome). У данного пациента также определено носительство ε2 аллеля гена *APOE*. Генотипы, содержащие ε2 аллель, ассоциированы с более низкими уровнями общего холестерина сыворотки и холестерина липопротеинов низкой плотности и более высоким уровнем триглицеридов [107]. У носителей варианта ε2 возможно развитие гиперлипидемии III типа при наличии дополнительных факторов риска ССЗ [120].

У двух неродственных пациентов с наличием в коронарных сосудах как стабильных, так и нестабильных бляшек по данным гистологического исследования, выявлен вариант rs5110 (NC_000011.9:g.116691634C>A) гена *APOA5*. Ассоциация варианта rs5110 (Gly360Thr) с метаболическим синдромом была показана в исследовании случай/контроль [358].

В результате исследования получены новые знания о спектре вариантов в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *CYP7A1*, *LIPA*, *STAP1*,

PNPLA5 и в генах *ABCA1*, *APOA1*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* у пациентов с коронарным атеросклерозом.

Изучение транскриптома атеросклеротической бляшки на разных этапах ее развития и выявление тканеспецифических транскриптов, маркирующих процессы деструкции, является актуальным направлением в понимании механизмов развития атерогенеза. Наше исследование было направлено на выявление тканеспецифических транскриптов, маркирующих атеросклеротический процесс на стадии распада атеросклеротической бляшки.

Было проведено транскриптомное профилирование двух типов бляшек – стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа – у двух неродственных пациентов, в двух технических повторах, с последующим анализом дифференциально экспрессирующихся генов.

Статистически значимые различия в экспрессии между типами бляшек были отмечены в генах *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *LIPA*, *STAP1*, *ABCA1*, *APOA1*, *APOE*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*.

Наблюдалось 8-ми кратное статистически значимое увеличение уровня экспрессии *APOE* ($p < 0,0001$) в нестабильных атеросклеротических бляшках дистрофически-некротического типа. В стабильных атеросклеротических бляшках наблюдалось 8-ми кратное статистически значимое увеличение уровня экспрессии генов *LDLR* и *APOB* ($p < 0,0001$).

Не было получено статистически значимых различий в изменении уровнях экспрессии генов *ABCG5*, *ABCG8*, *APOC3*, *CETP*, *CLPS*, *CYP7A1* и *PNPLA5*.

Полученные нами данные о дифференциальной экспрессии генов аполипопротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках согласуются с ранее опубликованными результатами Sulkava, M. et al. [272]: в которых были показаны, несколько семейств генов, связанных с транспортом липидов, с максимальными различиями экспрессии в атеросклеротических бляшках. Активность аполипопротеина D была снижена во всех исследованных артериальных руслах, в то время как экспрессия аполипопротеина Е и аполипопротеина С1 значительно

повышалась в атеросклеротических бляшках. Аполипопротеин С1 был особенно активирован в каротидных бляшках.

Таким образом, впервые определена дифференциальная экспрессия генов липидного обмена между образцами стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа у пациентов с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без ОКС со стабильной стенокардией напряжения II-IV ФК.

Совокупность эпигеномных, транскриптомных, протеомных и метаболомных исследований по-прежнему актуальна для формирования сетей сигнальной трансдукции у человека [267, 268]. Современные методы диагностики позволяют оценить степень распространения атеросклеротического повреждения и локализацию отдельных бляшек, но не могут прогнозировать ее поведение. Развитие и прогрессирование атеросклеротического процесса сопровождается появлением серии белковых медиаторов воспаления и значительной активностью хемотаксиса [360]. Обнаружение полного пула транскриптов стабильной и нестабильной атеросклеротической бляшки и сравнительный анализ по количественному и качественному составу транскриптов между двумя группами бляшек, позволит выявить маркеры дестабилизации для дальнейшей разработки новых подходов к диагностике атеросклероза, его осложнений и разработке таргетных препаратов.

Для максимально полного использования в клинической медицине результатов современных молекулярно-генетических исследований важно развивать интеграцию молекулярных технологий, биоинформатики и клинических дисциплин.

ВЫВОДЫ

1. В европеоидной популяционной группе Западной Сибири частота редких аллелей для изученных вариантов генов липидного обмена *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* составила: rs2230806 – 26%, rs2066718 – 12%, rs670 – 27%, rs5742904 – 0,7%, rs1042023 – 1,7%, rs5128 – 10,5%, $\epsilon 2$ – 9,0%, $\epsilon 4$ – 11,0% (rs429358 и rs7412), rs708272 – 46,8%, rs2766597 – 0,4%, rs320 – 26,8%, rs5888 – 43,3% и rs2228314 – 29,5%, соответственно.

2. В подвыборке лиц с максимально высокими значениями общего холестерина крови (>95 перцентилья) из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири выявлены редкие «вероятно патогенные» варианты в гене *LDLR*: rs2077408020, rs768563000, rs121908040, rs137929307, rs1225797407.

3. В подвыборке лиц с нормальными и низкими значениями общего холестерина крови из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири не выявлено редких вариантов в гене *LDLR*.

4. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири варианты rs429358 и rs7412 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) гена *APOE* статистически значимо ассоциированы со средними уровнями общего холестерина крови ($p=0,0001$), ХС-ЛНП ($p=0,0001$), ТГ ($p=0,0001$), ИА ($p=0,0001$). Максимальное значение среднего уровня общего холестерина крови и максимальный индекс атерогенности выявлены у носителей генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$, максимальное значение среднего уровня ХС-ЛНП определено у носителей генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$.

5. В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами варианта rs708272 гена *CETP* и уровнями ХС-ЛВП ($p=0,0001$).

6. В подвыборке лиц из популяционной группы европеоидного населения Западной Сибири аллель Т варианта rs320 гена *LPL* ассоциирован с повышением количества атерогенных мелких плотных частиц ЛНП на нисходящей кривой субфракционного профиля ЛНП ($p=0,02$).

7. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией в 47,5% выявлены редкие «патогенные» и «вероятно патогенные» варианты в генах, регулирующих липидный обмен. Впервые описаны редкие варианты гена *LDLR* в позиции chr19:11213415 (NM_000527:exon3:c.G266C:p.C89S) и в позиции chr19:11222252 (NM_000527:exon8:c.T1123G:p.Y375D). Определены с использованием MLPA анализа делеции в образцах ДНК двух неродственных пациентов: делеция 2-10 экзонов гена *LDLR* (NM_000527.4:c.(67+1_68-1)_(1586+1_1587-1)del) и делеция 15 экзона гена *LDLR* (NM_000527.4: c.(2140+1_2141-1)_(2311+1_2312-1)del).

8. У пациентов с фенотипом семейной гиперхолестеринемии при выполнении полногеномного секвенирования ДНК впервые определен гетерозиготный вариант rs760657350 в гене *PLD1*: c.2430-1G>A; ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: c.2426del (p.Leu809CysfsTer2); новый миссенс-вариант c.10313C>G (p.Pro3438Arg) в гене *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: c.165del (p.Ser56AlafsTer11) гена *CETP*.

9. У пациентов с коронарным атеросклерозом выполнен анализ спектра вариантов в генах липидного обмена методом полноэкзомного секвенирования: выявлен редкий вариант в гене *LDLR* rs774600508 в гетерозиготной форме и вариант rs5110 гена *APOA5* в гетерозиготной форме.

10. У пациентов с коронарным атеросклерозом показано повышение экспрессии генов *ABCA1*, *APOE*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1* и *STAP1* в нестабильной атеросклеротической бляшке дистрофически-некротического типа и определено повышение экспрессии генов *APOB*, *LDLR*, *LDLRAP1* и *SREBF2* в стабильной атеросклеротической бляшке фиброзного типа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для диагностики и профилактики атерогенной гиперлипидемии III типа обосновано включение генотипирования rs429358 и rs7412 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) гена *APOE* в генетические рискометры сердечно-сосудистых заболеваний. При выявлении у пациента генотипа $\epsilon 2/\epsilon 2$ гена *APOE* рекомендован регулярный контроль липидного и гликемического профилей. При выявлении у пациента генотипа $\epsilon 4/\epsilon 4$ гена *APOE* рекомендована ранняя профилактика ИБС.

2. Для ранней диагностики и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с диагнозом семейная гиперхолестеринемия, целесообразно использование таргетного секвенирования для быстрой и экономичной верификации СГХС молекулярно-генетическими методами. Рекомендовано включение в таргетную панель не только генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, но и генов *ABCG5*, *APOA5*, *APOC3*, *APOE*, *LPL*, *SREBF1*.

3. Рекомендовано направление на молекулярно-генетическое исследование с использованием таргетного секвенирования пациентов, но только с 6 и более баллами («определенная» и «вероятная» СГХС) по критериям Dutch Lipid Clinic Network, но и с 3-5 баллами («возможная» СГХС) для ранней диагностики семейной и комбинированной гиперхолестеринемии.

4. Широкое внедрение в практику метода мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA) для определения делеций и дупликаций в гене *LDLR* позволит дополнительно выявить до 2-3% пробандов с СГХС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИМ – инфаркт миокарда

ИМТ – индекс массы тела

ЛВП – липопротеины высокой плотности

ЛНП – липопротеины низкой плотности

ЛОНП – липопротеины очень низкой плотности

ЛПП – липопротеины промежуточной плотности

ОНВ – однонуклеотидные варианты

ОНП – однонуклеотидный полиморфизм

ОХС – общий холестерин сыворотки

ПИКС – постинфарктный кардиосклероз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

ПЦР-РТ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

СГХС – семейная гиперхолестеринемия

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ТГ – триглицериды

ФК – функциональный класс

ХС-ЛНП – холестерин липопротеинов низкой плотности

ХС-ЛВП – холестерин липопротеинов высокой плотности

ABCA1 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства А, член 1

ABCG1 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G, член 1

ABCG5 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G, член 5

ABCG8 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G, член 8

ANGPTL3 – ген ангиопоэтин подобный 3

APOA1 – ген аполипопротеина A1

APO4 – ген аполипопротеина A4

APOA5 – ген аполипопротеина A5

APOB – ген аполипопротеина B

APOC2 – ген аполипопротеина C2

APOC3 – ген аполипопротеина C3

APOD – ген аполипопротеина D

APOE – ген аполипопротеина E

CETP – ген белка, переносящего эфиры холестерина

CLPS – ген колипазы

CYP7A1 – ген цитохром P450 семейство 7 подсемейство A член 1

EL – эндотелиальная липаза

HL – печеночная липаза

HMGCR – ген 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы

LCAT – лецитинхолинацилтрансфераза (ЛХАТ)

LCAT – ген лецитинхолинацилтрансферазы

LDLR – ген рецептора липопротеинов низкой плотности

LDLRAP1 – ген белка адаптера рецепторов липопротеинов низкой плотности

LIPA – ген липаза A, тип лизосомальной кислоты

LIPC – ген липазы C, печеночного типа

LIPG – ген липазы G, эндотелиального типа

LMF1 – ген фактора созревания липазы 1

LMNA – ген ламина A/C

LPA – ген липопротеина(a)

LPL – ген липопротеинлипазы

LRP1B – ген белка 1B подобного LDL рецептору

MTTP – ген микросомального белка переносчика триглицеридов

NPC1L1 – ген NPC1 подобного внутриклеточного транспортера холестерина 1

PCSK9 – ген пропротеин конвертазы субтилизин / кексин типа 9

PLD1 – ген фосфолипазы D1

PLIN1 – ген перилипина 1

PLTP – белок-переносчик фосфолипида

PNPLA5 – ген пататин-подобной фосфолипазы 5

POLD1 – ген ДНК-полимеразы дельта 1, каталитической субъединицы

PPARA – ген альфа-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом

PPARG – ген гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом

SIDT1 – ген кодирующем трансмембранный белок 1 семейства SID1

SMAD1- SMAD7, SMAD9 – гены, кодирующие 1-7 и 9 члены семейства SMAD-белков

SR1B – ген скэвэнжер-рецептора 1B

SREBPF2 – ген белка, связывающего стерол-регулирующий элемент 2

SCAP – белок, активирующий разделение SREBPs

STAP1 – ген члена семейства адаптеров для преобразования сигналов 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organisation, Noncommunicable diseases [Электронный ресурс]. – URL: https://www.who.int/health-topics/noncommunicable-diseases#tab=tab_1 (16.10.2023).
2. Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990–2019: update from the GBD 2019 study / G.A. Roth, G.A. Mensah, C.O. Johnson, et al. // J. Am. Coll. Cardiol. – 2020. – Vol. 76. – P. 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>.
3. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health / M. Vaduganathan, G.A. Mensah, J.V. Turco, et al. // J Am Coll Cardiol. – 2022. – Vol. 80(25) – P. 2361-2371. doi:10.1016/j.jacc.2022.11.005
4. Heart Disease and Stroke Statistics-2023 Update: A Report from the American Heart Association / C.W. Tsao, A.W. Aday, Z.I. Almarzooq, et al. // Circulation. – 2023. – Vol. 147(8). – P. e622. doi: 10.1161/CIR.0000000000001137.
5. Abifadel, M. Genetic and molecular architecture of familial hypercholesterolemia / M. Abifadel, C. Boileau // J Intern Med. – 2023. – Vol. 293(2). – P. 144-165. doi: 10.1111/joim.13577.
6. García-Giustiniani D., Stein R. Genetics of Dyslipidemia / D. García-Giustiniani, R. Stein // Arquivos brasileiros de cardiologia. – 2016. – Vol. 106(5). – P. 434–438. <https://doi.org/10.5935/abc.20160074>.
7. Нарушения липидного обмена. Клинические рекомендации 2023. / М.В. Ежов, В.В. Кухарчук, И.В. Сергиенко и др. // Российский кардиологический журнал. – 2023. – №5. – С. 5471. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2023-5471>.
8. Fredrickson, D.S. Fat transport in lipoproteins an integrated approach to mechanisms and disorders / D.S. Fredrickson, R.I. Levy, R.S. Lees // N Engl J Med. – 1967. – Vol. 276(1). – P. 34-42. doi: 10.1056/NEJM196701052760107.
9. Metabolic Syndrome, Dyslipidemia and Regulation of Lipoprotein Metabolism / J. Iqbal, A. Al Qarni, A. Hawwari, et al. // Curr Diabetes Rev. – 2018. – Vol. 14(5). – P. 427-433. doi: 10.2174/1573399813666170705161039. PMID: 28677496.

10. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* Variants of Index Patients with Familial Hypercholesterolemia in Russia / A. Meshkov, A. Ershova, A. Kiseleva, et al. // *Genes*. – 2021. – Vol. 12(1). – P. 66-83. <https://doi.org/10.3390/genes12010066>.
11. The Genetics of Coronary Artery Disease: A Vascular Perspective / LNK Quaye, CE Dalzell, P Deloukas, et al. // *Cells*. – 2023. – Vol. 12(18). – P. :2232. doi: 10.3390/cells12182232.
12. Association of low-frequency and rare coding-sequence variants with blood lipids and coronary heart disease in 56,000 whites and blacks / G.M. Peloso, P.L. Auer, J.C. Bis, et al. // *Am J Hum Genet*. – 2014. – Vol. 94(2). – P. 223-32. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.01.009.
13. From lipid locus to drug target through human genomics / S.W. van der Laan, E.L. Harshfield, D. Hemerich, et al. // *Cardiovascular Research* – 2018. – Vol. 114(9). – P. 1258–1270. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy120>
14. Familial Hypercholesterolemia: A Systematic Review of Guidelines on Genetic Testing and Patient Management / G. Mgliara, V. Baccolini, A. Rosso, E. D'Andrea, et al. // *Front. Public Health* – 2017. – Vol. 5. – P. 252. doi: 10.3389/fpubh.2017.00252
15. Genetic testing in dyslipidemia: A scientific statement from the National Lipid Association / E.E. Brown, A.C. Sturm, M. Cuchel, et al. // *Atherosclerosis* – 2020. – Vol. 14(4). P. 398-413, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jacl.2020.04.011>
16. Secondary hyperlipidemias: etiology and pathogenesis / A.I. Ershova, D.O. Al Rashi, A.A. Ivanova, et al. // *Russian Journal of Cardiology* – 2019. – Vol. 5. – P. 74-81. (In Russ.).
17. Familial Hypercholesterolemia in Russia: Three Decades of Genetic Studies / V. Vasilyev, F. Zakharova, T. Bogoslovskay, et al. // *Frontiers in genetics* – 2020. – Vol. 11. – P. 550591. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.550591>
18. How registers could enhance knowledge and characterization of genetic dyslipidaemias: The experience of the LIPIGEN in Italy and of other networks for familial hypercholesterolemia / M. Gazzotti, M. Casula, E. Olmastroni, et al. // *Atherosclerosis Supplements* – 2020. – Vol. 42. – P. e35-ee40. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2021.01.007>.

19. Paththinige, C.S. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia - a comprehensive literature review / C.S. Paththinige, N.D. Sirisena, V. Dissanayake // *Lipids Health Dis* – 2017. – Vol. 16(1). – P. 103. doi: 10.1186/s12944-017-0488-4.
20. Phillips, M.C. Is ABCA1 a lipid transfer protein? / Phillips M.C. // *J Lipid Res* – 2018. – Vol. 59(5). – P. 749-763. doi: 10.1194/jlr.R082313.
21. *ABCA1* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/19> (16.01.2024)
22. Tangier disease: epidemiology, pathophysiology, and management / M. Puntoni, F. Sbrana, F. Bigazzi, et al. // *Am J Cardiovasc Drugs* – 2012. – Vol. 12(5). – P. 303-311. doi: 10.2165/11634140-000000000-00000.
23. ABCA1 and metabolic syndrome; a review of the ABCA1 role in HDL-VLDL production, insulin-glucose homeostasis, inflammation and obesity / M.M. Babashamsi, S.Z. Koukhaloo, S. Halalkhor, et al. // *Diabetes Metab Syndr*. – 2019. – Vol. 13(2). – P. 1529-1534. doi: 10.1016/j.dsx.2019.03.004.
24. Associations of the ABCA1 gene polymorphisms with plasma lipid levels: A meta-analysis / Z. Lu, Z. Luo, A. Jia, et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. – Vol. 97(50). – P. e13521. doi: 10.1097/MD.00000000000013521.
25. Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux / L. Chen, Z.W. Zhao, P.H. Zeng, et al. // *Cell Cycle*. – 2022. – Vol. 21(11). – P. 1121-1139. doi:10.1080/15384101.2022.2042777.
26. Relation of High-Density Lipoprotein Charge Heterogeneity, Cholesterol Efflux Capacity, and the Expression of High-Density Lipoprotein-Related Genes in Mononuclear Cells to the HDL-Cholesterol Level / A.D. Dergunov, D.Y. Litvinov, E.V. Bazaeva, et al. // *Lipids* – 2018. – Vol. 53(10). – P. 979-991. doi: 10.1002/lipd.12104.
27. Association between ABCA1 Gene Polymorphisms and Plasma Lipid Concentration: A Systematic Review and Meta-Analysis / S.-Y. Shim, H.-Y. Yoon, J. Yee, et al. // *J. Pers. Med.* – 2021. – Vol. 11. – P. 883. <https://doi.org/10.3390/jpm11090883>

28. Increased prevalence of clinical and subclinical atherosclerosis in patients with damaging mutations in ABCA1 or APOA1 / O. Abdel-Razek, S.N. Sadananda, X. Li, et al. // *J Clin Lipidol.* – 2018. – Vol. 12(1). – P. 116-121. doi: 10.1016/j.jacl.2017.10.010.
29. A novel splicing mutation in the ABCA1 gene, causing Tangier disease and familial HDL deficiency in a large family / M. Maranghi, G. Truglio, A. Gallo, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2019. – Vol. 508(2). – P. 487-493. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.064.
30. Computational SNP Analysis and Molecular Simulation Revealed the Most Deleterious Missense Variants in the NBD1 Domain of Human ABCA1 Transporter / R. Dash, M.C. Ali, M.L. Rana // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21(20). – P. 7606. doi: 10.3390/ijms21207606/
31. Tangier Disease / Burnett JR, Hooper AJ, McCormick SPA, Hegele RA. – Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2019. – 11 P. PMID: 31751110.
32. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In Reverse Cholesterol Transport / H.H. Wang, G. Garruti, M. Liu et al. // *Ann Hepatol.* – 2017. – Vol. 16(Suppl.1). – P. s3-105. (s27-s42). doi: 10.5604/01.3001.0010.5495.
33. Brothers in Arms: ABCA1- and ABCG1-Mediated Cholesterol Efflux as Promising Targets in Cardiovascular Disease Treatment / S.J.C.M. Frambach, R. de Haas, J.A.M. Smeitink, et al. // *Pharmacol Rev.* – 2020. – Vol. 72(1). – P. 152-190. doi: 10.1124/pr.119.017897.
34. Structure of HDL: particle subclasses and molecular components / A. Kontush, M. Lindahl, M. Lhomme, et al. // *Handb Exp Pharmacol.* – 2015. – Vol. 224. – P. 3-51. doi: 10.1007/978-3-319-09665-0_1.
35. Rached, F.H. HDL particle subpopulations: Focus on biological function / F.H. Rached, M.J. Chapman, A. Kontush, et al. // *Biofactors.* – 2015. – Vol. 41(2). – P. 67-77. doi: 10.1002/biof.1202.
36. Composition-function analysis of HDL subpopulations: influence of lipid composition on particle functionality / K. Niisuke, Z. Kuklenyik, K.V. Horvath, et al. // *J Lipid Res.* – 2020. – Vol. 61(3). – P. 306-315. doi: 10.1194/jlr.RA119000258.

37. Fan, Q. Association of rs2230806 in ABCA1 with coronary artery disease: An updated meta-analysis based on 43 research studies / Q. Fan, Y. Zhu, F. Zhao // *Medicine (Baltimore)*. – 2020. – Vol. 99(4). – P. e18662. doi: 10.1097/MD.00000000000018662.
38. ABCA1 variants rs2230806 (R219K), rs4149313 (M8831I), and rs9282541 (R230C) are associated with susceptibility to coronary heart disease / F. Wang, Y. Ji, X. Chen // *J Clin Lab Anal.* – 2019. – Vol. 33(6). – P. e22896. doi: 10.1002/jcla.22896.
39. Effects of ABCA1 gene polymorphisms on risk factors, susceptibility and severity of coronary artery disease / Z. Lu, Z. Luo, A. Jia, et al. // *Postgrad Med J.* – 2020. – Vol. 96(1141). – P. 666-673. doi: 10.1136/postgradmedj-2019-136917.
40. The effect of ABCA1 rs2230806 common gene variant on plasma lipid levels in patients with dyslipidemia / G.P. Smirnov, P.P. Malyshev, T.A. Rozhkova, et al. // *Klin Lab Diagn.* – 2018. – Vol. 63(7). – P. 410-413. Russian. PMID: 30720955.
41. A Meta-Analysis of the Associations Between the ATP-Binding Cassette Transporter ABCA1 R219K (rs2230806) Polymorphism and the Risk of Type 2 Diabetes in Asians / D. Jung, S. Cao, M. Liu, et al. // *Horm Metab Res.* – 2018. – Vol. 50(4). – P. 308-316. doi: 10.1055/a-0583-0201.
42. Association of genetic variants of ABCA1 with susceptibility to dementia: (SADEM study) / J.C. Teresa, C. Fernando, M.R. Nancy, et al. // *Metab Brain Dis.* – 2020. – Vol. 35(6). – P. 915-922. doi: 10.1007/s11011-020-00577-4.
43. Influence of four polymorphisms in ABCA1 and PTGS2 genes on risk of Alzheimer's disease: a meta-analysis / Q. Chen, B. Liang, Z. Wang, et al. // *Neurol Sci.* – 2016. – Vol. 37(8). – P. 1209-20. doi: 10.1007/s10072-016-2579-9.
44. Genetic determinants of HDL metabolism / A. Ossoli, M. Gomaschi, G. Franceschini // *Curr Med Chem.* – 2014. Vol. 21(25) – P. 2855-63. doi: 10.2174/0929867321666140303154452.
45. Ronsein, G.E. Inflammation, remodeling, and other factors affecting HDL cholesterol efflux / G.E. Ronsein, T. Vaisar. // *Curr Opin Lipidol.* – 2017. – Vol. 28(1). – P. 52-59. doi: 10.1097/MOL.0000000000000382.
46. Role of ABCA1 in Cardiovascular Disease. / J. Wang, Q. Xiao, L. Wang, et al. // *J Pers Med.* – 2022. – Vol. 12(6). – P. 1010. doi:10.3390/jpm12061010.

47. *APOA1* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/335> (16.01.2024).
48. The association between apolipoprotein A-1 plasma level and premature coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis / M. Haji Aghajani, A. Madani Neishaboori, K. Ahmadzadeh, et al. // *Int J Clin Pract.* – 2021. – Vol. 75(11). – P. e14578. doi: 10.1111/ijcp.14578.
49. Schaefer, E.J. The biochemical and genetic diagnosis of lipid disorders / E.J. Schaefer, A.S. Geller, G. Endress // *Curr Opin Lipidol.* – 2019. – Vol. 30(2). – P. 56-62. doi: 10.1097/MOL.0000000000000590.
50. Титов, В.Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов / В.Н. Титов. – М: «Триада», 2008. – 193 с.
51. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states / B.F. Asztalos, E.J. Schaefer, K.V. Horvath // *J Lipid Res.* – 2007. – Vol. 48(3). – P. 592-9. doi: 10.1194/jlr.M600403-JLR200.
52. APOA1: a Protein with Multiple Therapeutic Functions / B.J. Cochran, K.L. Ong, B. Manandhar // *Curr Atheroscler Rep.* – 2021. – Vol. 23(3). – P. 11. doi: 10.1007/s11883-021-00906-7.
53. Leveraging knowledge of HDLs major protein ApoA1: Structure, function, mutations, and potential therapeutics. / A.S. Bhale, K. Venkataraman. // *Biomed Pharmacother.* – 2022. – Vol. 154. – P. 113634. doi:10.1016/j.biopha.2022.113634.
54. Schaefer, E.J. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease / E.J. Schaefer, R.D. Santos, B.F. Asztalos // *Curr Opin Lipidol.* – 2010. – Vol. 21(4). – P. 289-97. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833c1ef6.
55. Chiesa, G. Apolipoprotein A-I(Milano): current perspectives / G. Chiesa, C.R. Sirtori // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2003. – Vol. 14. – P. 159-63.
56. Uehara, Y. High-Density Lipoprotein-Targeted Therapy and Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides / Y. Uehara, G. Chiesa, K. Saku // *Circ J.* – 2015. – Vol. 79(12). – P. 2523-8. doi: 10.1253/circj.CJ-15-0960.
57. Polyunsaturated fatty acids modulate the effects of the *APOA1* G-A polymorphism on HDL-cholesterol concentrations in a sex-specific manner: the Framingham Study /

- J.M. Ordovas, D. Corella, L. A. Cupples, et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2002. – Vol.75. – P. 38–46.
58. Al-Yahyaee, S.A.S. Apolipoprotein A1 -75 G/A (M1-) polymorphism and Lipoprotein(a); Anti- vs. Pro-Atherogenic properties / S.A.S Al-Yahyaee, M.N. Al-Kindi, A.I. Al-Bahrani // *Lipids in Health and Disease.* – 2007. – Vol. 6. – P. 19-25.
59. Chen, E.S. Apolipoprotein A1 gene polymorphisms as risk factors for hypertension and obesity / Chen E.S. // *Clin. Exp. Med.* – 2009. – Vol.6. – P. 32-36.
60. Implication of the rs670 variant of *APOA1* gene with lipid profile, serum adipokine levels and components of metabolic syndrome in adult obese subjects / D.A. de Luis, O. Izaola, D Primo, et al. // *Clin Nutr.* – 2019. – Vol. 38(1) – P. 407-411. doi: 10.1016/j.clnu.2017.12.007.
61. Ertek, S. High-density Lipoprotein (HDL) Dysfunction and the Future of HDL / S. Ertek // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2018. – Vo. 16(5). – P. 490-498. doi: 10.2174/1570161115666171116164612.
62. Su, X. The exchangeable apolipoproteins in lipid metabolism and obesity / Su X., Peng D. // *Clin Chim Acta.* – 2020. – Vol. 503. – P. 128-135. doi: 10.1016/j.cca.2020.01.015.
63. *APOB* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338> (16.01.2024).
64. Apolipoprotein B Particles and Cardiovascular Disease: A Narrative Review / A.D. Sniderman, G. Thanassoulis, T. Glavinovic, et al. // *JAMA Cardiol.* – 2019. – Vol. 4(12). – P. 1287-1295. doi: 10.1001/jamacardio.2019.3780.
65. Polymorphism in APOB associated with increases low-density lipoprotein levels in both genders in the general population / M. Benn, B.G. Nordestgaard, J.S. Jensen, et al. // *Clin. Endocr. Metab.* – 2005. – Vol. 90. – P. 5797-5803.
66. Sirwi, A. Lipid transfer proteins in the assembly of apoB-containing lipoproteins / A. Sirwi, M.M. Hussain // *J Lipid Res.* – 2018. – Vol. 59(7). – P. 1094-1102. doi: 10.1194/jlr.R083451.

67. ApoB100 and Atherosclerosis: What's New in the 21st Century? / D. Kounatidis, N.G. Vallianou, A. Poulaki, et al. // *Metabolites*. – 2024. – Vol. 14(2) – P. 123. doi:10.3390/metabo14020123.
68. Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids / T.M. Teslovich, K. Musunuru, A.V. Smith, et al. // *Nature*. – 2010. – V. 466. – P. 707-713.
69. Familial combined hyperlipidemia: current knowledge, perspectives, and controversies / O.Y. Bello-Chavolla, A. Kuri-García, M. Ríos-Ríos, et al. // *Rev Invest Clin*. – 2018. – Vol. 70(5). – P. 224-236. doi: 10.24875/RIC.18002575.
70. Familial combined hyperlipidemia: An overview of the underlying molecular mechanisms and therapeutic strategies / E. Taghizadeh, R.J. Esfehiani, A. Sahebkar, et al. // *IUBMB Life*. – 2019. – Vol. 71(9). – P. 1221-1229. doi: 10.1002/iub.2073.
71. APOB-Related Familial Hypobetalipoproteinemia / J.R. Burnett, A.J. Hooper, R.A. Hegele – Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 2021 – 16 P. PMID: 33983694.
72. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B100 / J. Borén, U. Ekström, B. Agren, et al. // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276(12). – P. 9214-8. doi: 10.1074/jbc.M008890200.
73. Autosomal dominant type IIa hypercholesterolemia: evaluation of the respective contributions of LDLR and APOB gene defects as well as a third major group of defects / B. Saint-Jore, M. Varret, C. Dacet, et al. // *Eur J Hum Genet*. – 2000. – Vol. 8(8). – P. 621-30. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200516.
74. Воевода, М.И. Полиморфизм и связь с факторами риска некоторых генов предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям в Новосибирске и этнических группах Сибири / Воевода М.И., Шахтштейнер Е.В. // В сборнике: Мониторинг сердечно-сосудистой заболеваемости, смертности и их факторов риска в разных регионах мира (проект ВОЗ MONICA). В двух томах. – Новосибирск, 2016. – С. 468-491.
75. Structural analysis of APOB variants, p.(Arg3527Gln), p.(Arg1164Thr) and p.(Gln4494del), causing Familial Hypercholesterolaemia provides novel insights into

- variant pathogenicity / J.A. Fernández-Higuero, A. Etxebarria, A. Benito-Vicente, et al. // Sci Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 18184. doi: 10.1038/srep18184.
76. Relationship of Familial Hypercholesterolemia and High Low-Density Lipoprotein Cholesterol to Ischemic Stroke: Copenhagen General Population Study / S. Beheshti, C.M. Madsen, A. Varbo, et al. // Circulation. – 2018. – Vol. 138(6). – P. 578-589. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033470.
77. Systematic analysis of variants related to familial hypercholesterolemia in families with premature myocardial infarction / I. Brønne, M. Kleinecke, B. Reiz, et al. // Eur J Hum Genet. – 2016. – Vol. 24(2). – P. 191-7. doi: 10.1038/ejhg.2015.100.
78. *APOC3* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/345> (16.01.2024)
79. A Null Mutation in Human APOC3 Confers a Favorable Plasma Lipid Profile and Apparent Cardioprotection / T.I. Pollin, C.M. Shen, H. Damcott, et al. // Science. – 2008. – Vol. 322 (5908). – P. 1702-1705.
80. Borén, J. The Roles of ApoC-III on the Metabolism of Triglyceride-Rich Lipoproteins in Humans / J. Borén, C.J. Packard, M.R. Taskinen // Front Endocrinol (Lausanne) – 2020. – Vol. 11. – P. 474. doi: 10.3389/fendo.2020.00474.
81. Transcriptional regulatory mechanisms of the human apolipoprotein genes in vitro and in vivo / V.I. Zannis, H.-Y. Kan, A. Kritis, et al. // Curr. Opin. Lipid. – 2001. – Vol. 12. – P. 181-207.
82. Li, Y. Apolipoprotein C3 gene variants and the risk of coronary heart disease: A meta-analysis / Y. Li, C. Li, J. Gao // Meta Gene. – 2016. – Vol. 9. – P. 104-9. doi: 10.1016/j.mgene.2016.04.004.
83. Apolipoprotein C-III and cardiovascular diseases: when genetics meet molecular pathologies / I. Dib, A. Khalil, R. Chouaib // Mol Biol Rep. – 2021. – Vol. 48(1) – P. 875-886. doi: 10.1007/s11033-020-06071-5.
84. Association between apolipoprotein C3 Sst I, T-455C, C-482T and C1100T polymorphisms and risk of coronary heart disease / B. Lin, Y. Huang, M. Zhang, et al. // BMJ Open. – 2014. – Vol. 4(1). – P. e004156. doi: 10.1136/bmjopen-2013-004156.

85. An APOC3 3'UTR variant associated with plasma triglycerides levels and coronary heart disease by creating a functional miR-4271 binding site / S.L. Hu, G.L. Cui, J. Huang et al. // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 32700. doi: 10.1038/srep32700.
86. Genetic polymorphisms of apolipoprotein C-III and insulin in survivors of myocardial infarction / G.A.A. Ferns, J. Stocks, C. Ritchie, et al. // *Lancet.* – 1985. – Vol. 326. – P. 300-303.
87. Association of a DNA polymorphism in the apolipoprotein C-III gene with diverse hyperlipidemic phenotypes / H.E. Henderson, S.V. Landon, J. Michie, et al. // *Hum. Genet.* – 1987. – Vol. 75. – P. 62-65.
88. Association of serum lipids and coronary artery disease with polymorphisms in the apolipoprotein AI-CIII-AIV gene cluster / H. Rai, N. Sinha, J. Finn, et al. // *Cogent Med.* – 2016. – Vol. 3(1). – P. 1266789. doi: 10.1080/2331205X.2016.1266789.
89. Analysis of common and coding variants with cardiovascular disease in the Diabetes Heart Study / J.N. Adams, L.M. Raffield, B.I. Freedman // *Cardiovasc Diabetol.* – 2014. – Vol. 13. – P. 77. doi: 10.1186/1475-2840-13-77.
90. Interactions of Environmental Factors and APOA1-APOC3-APOA4-APOA5 Gene Cluster Gene Polymorphisms with Metabolic Syndrome / Y. Wu, Y. Yu, T. Zhao, et al. // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 11(1). – P. e0147946. doi: 10.1371/journal.pone.0147946.
91. Sequence analysis and variant identification at the APOC3 gene locus indicates association of rs5218 with BMI in a sample of Kuwaiti's / Z.H. Malalla, A.E. Al-Serri, H.M. AlAskar, et al. // *Lipids Health Dis.* – 2019. – Vol. 18(1). – P. 224. doi: 10.1186/s12944-019-1165-6.
92. Association analysis of genetic variants with metabolic syndrome components in the Moroccan population / F. Lakbakbi El Yaagoubi, H. Charoute, I. Morjane, et al. // *Curr Res Transl Med.* – 2017. – Vol. 65(3). – P. 121-125. doi: 10.1016/j.retram.2017.08.001.
93. *APOE* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/348> (16.01.2024).

94. Getz, G.S. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport / G.S. Getz, C.A. Reardon // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19(11). – P. 3479. doi: 10.3390/ijms19113479.
95. Flowers, S.A. APOE in the normal brain / S.A. Flowers, G.W. Rebeck // *Neurobiol Dis.* – 2020. – Vol. 136. – P. 104724. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104724.
96. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders / R.W. Mahley // *J Mol Med (Berl).* – 2016. – Vol. 94(7). – P. 739-46. doi: 10.1007/s00109-016-1427-y.
97. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology / R.W. Mahley // *Science.* – 1988. – Vol. 240. – P. 622-630.
98. Weisgraber K.H. Apolipoprotein E: structure-function relationships / K.H. Weisgraber // *Adv. Protein. Chem.* – 1994. – Vol. 45. – P. 249-302.
99. Site-specific mutagenesis of human apolipoprotein E. Receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions / A. Lalazar, K.H. Weisgraber, S.C. Rall et al. // *J. Biol. Chem.* – 1988. – Vol. 263. – P. 3542-3545.
100. Breslow, J.L. Genetic regulation of apolipoproteins / Breslow J.L. // *Amer. Heart J.* – 1987. – Vol. 113. – P. 422-427.
101. Reardon, C.A. Differential metabolism of apolipoprotein E isoproteins / C.A. Reardon // *J. Lab. Clin. Med.* – 2002. – Vol. 140(5). – P. 301-302.
102. Kacperczyk, M. The Role of ApoE Expression and Variability of Its Glycosylation in Human Reproductive Health in the Light of Current Information / M. Kacperczyk, A. Kmiecik, E.M. Kratz // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22(13). – P. 7197. doi: 10.3390/ijms22137197.
103. Circulating Apolipoprotein E Concentration and Cardiovascular Disease Risk: Meta-analysis of Results from Three Studies / R. Sofat, J.A. Cooper, M. Kumari, et al. // *PLoS Med.* – 2016. Vol. 13(10). – P. e1002146. doi: 10.1371/journal.pmed.1002146.
104. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins / R.E. Pitas, J.K. Boyles, S.H. Lee, et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1987. – Vol. 917(1). – P. 148-161.

105. Serrano-Pozo, A. APOE and Alzheimer's disease: advances in genetics, pathophysiology, and therapeutic approaches / A. Serrano-Pozo, S. Das, B.T. Hyman // *Lancet Neurol.* – 2021. – Vol. 20(1). – P. 68-80. doi: 10.1016/S1474-4422(20)30412-9.
106. Lane-Donovan, C. The ApoE receptors Vldlr and Apoer2 in central nervous system function and disease / Lane-Donovan C., Herz J. // *J Lipid Res.* – 2017. Vol. 58(6). – P. 1036-1043. doi: 10.1194/jlr.R075507.
107. APOE gene variants in primary dyslipidemia / Y.A. Khalil, J.P. Rabès, C. Boileau // *Atherosclerosis.* – 2021. – Vol. 328. – P. 11-22. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.007.
108. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank / A.L. Lumsden, A. Mulugeta, A. Zhou et al. // *EBioMedicine.* – 2020. – Vol. 59. – P. 102954:1-102954:11, doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102954.
109. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations – the ECTIM Study / J-C. Lambert, T. Brousseau, V. Defoss, et al. // *Hum. Mol. Genet.* – 2000. – Vol. 9. – N1. – P. 57-61.
110. Effect of the APOE promoter polymorphisms on cerebral amyloid peptide deposition in Alzheimer's disease / J-C. Lambert, D. Mann, L. Goumide, et al. // *The Lancet.* – 2001. – Vol. 357. – P. 608-609.
111. Cerebral β -amyloid deposition is augmented by the -491AA promoter polymorphism in non-demented elderly individuals bearing the apolipoprotein E ϵ 4 allele / J. Pahnke, L.C. Walker, E. Schroeder, et al. // *Acta Neuropathol.* – 2003. – Vol. 105. - P. 25-29.
112. Apolipoprotein E -491 promoter polymorphism is an independent risk factor for Alzheimer's disease in the Chinese population / J.D. Yang, G.Y. Feng, J. Zhang, et al. // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 30(2). – P. 215.
113. Utermann, G. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man / G. Utermann, M. Hess, A. Steinmetz // *Nature.* – 1977. – Vol. 269. – P. 604-607.

114. Apolipoprotein E genotype, lifestyle and coronary artery disease: Gene-environment interaction analyses in the UK Biobank population / M.M. Bos, L. de Vries, P.C. Rensen, et al. // *Atherosclerosis*. – 2021. – Vol. 328. – P. 33-37. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.05.014.
115. Chauhan, G. Genetic Risk Factors for Ischemic and Hemorrhagic Stroke / G. Chauhan, S. Debette // *Curr Cardiol Rep*. – 2016. – Vol. 18(12). – P. 124. doi: 10.1007/s11886-016-0804-z.
116. Genetic Variations of the Apolipoprotein E Gene Determine the Plasma Triglyceride Levels after Heart Transplantation / A. Gonzalez-Amieva, J. Lopez-Miranda, F. Fuentes, et al. // *J. Heart Lung Transplant*. – 2000. – Vol. 19. – P. 765-770.
117. APOE polymorphism and the hypertriglyceridemic effect of dietary sucrose / A.T. Erkkila, E.S. Sarkkinen, V. Lindi, et al. // *Am. J. Clinical Nutrition*. – 2001. – Vol. 73(4) – P. 746-752.
118. Context-dependent and invariant associations between lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and apolipoprotein E genotype / R. Frikke-Schmidt, B.G. Nordestgaard, B. Agerholm-Larsen, et al. // *J. Lipid Research*. – 2000. – Vol. 41(11). – P. 1812-1822.
119. Data on plasma levels of apolipoprotein E, correlations with lipids and lipoproteins stratified by APOE genotype, and risk of ischemic heart disease / K.L. Rasmussen, A. Tybjaerg-Hansen, B.G. Nordestgaard, et al. // *Data Brief*. – 2016. – Vol. 6. – P. 923-32, doi: 10.1016/j.dib.2016.01.060.
120. The relation between apolipoprotein E (APOE) genotype and peripheral artery disease in patients at high risk for cardiovascular disease / C. Koopal, M.I. Geerlings, M. Muller, et al. // *Atherosclerosis*. – 2016. – Vol. 246. – P. 187-192. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.01.009.
121. CETP [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1071> (16.01.2024).
122. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis / A.V. Khera, M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, et al. // *N. Engl. J. Med*. – 2011. – Vol. 364. – P. 127–135. doi:10.1056/NEJMoa1001689.

123. Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts / Y. S. Aulchenko, S. Ripatti, I. Lindqvist, et al. // Nat Genet. – 2009. – Vol. 41. – P. 47-55.
124. Paththinige, C.S. Genetic determinants of inherited susceptibility to hypercholesterolemia – a comprehensive literature review / C.S. Paththinige, N.D. Sirisena, V.H.W. Dissanayake // Lipids Health Dis. – 2017. – Vol. 16. – P. 103. doi:10.1186/s12944-017-0488-4.
125. Relationship between CETP gene polymorphisms with coronary artery disease in Polish population / J. Iwanicka, T. Iwanicki, P. Niemiec, et al. // Mol. Biol. Rep. – 2018. – Vol. 45. – P. 1929–1935. doi:10.1007/s11033-018-4342-1.
126. Characteristics of coronary artery disease patients who have a polymorphism in the cholesterol ester transfer protein (CETP) gene / G.D. Aarikan, S. Isbir, S.G. Yilmaz // In Vivo. – 2019. – Vol. 33. – P. 787–792. doi:10.21873/invivo.11540.
127. Association of the polymorphisms of the cholesteryl ester transfer protein gene with coronary artery disease: a meta-analysis. / R. Zhang, Q. Xie, P. Xiao. // Front Cardiovasc Med. – 2023. – Vol. 10. – P. 1260679. doi:10.3389/fcvm.2023.1260679.
128. Associations of Cholesteryl Ester Transfer Protein TaqIB Polymorphism with the Composite Ischemic Cardiovascular Disease Risk and HDL-C Concentrations: A Meta-Analysis / S.X. Guo, M.H. Yao, Y.S. Ding, et al. // Int. J. Environ Res Public Health. – 2016. – Vol. 13. – P. 882. doi:10.3390/ijerph13090882.
129. *CETP* and *LCAT* Gene Polymorphisms Are Associated with High-Density Lipoprotein Subclasses and Acute Coronary Syndrome / G. Vargas-Alarcon, O. Perez-Mendez, G. Herrera-Maya, et al. // J.M.Lipids. – 2018. – Vol. 53. – P. 157–166. doi:10.1002/lipd.12017.
130. Sex-associated effect of *CETP* and *LPL* polymorphisms on postprandial lipids in familial hypercholesterolaemia / K.K. Anagnostopoulou, G.D. Kolovou, P.M. Kostakou, et al. // Lipids in Health and Disease. – 2009. – Vol. 8. – P. 24. doi:10.1186/1476-511X-8-24.
131. CLPS [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1208> (17.01.2024).

132. Xiao, X. The Arg92Cys colipase polymorphism impairs function and secretion by increasing protein misfolding / X. Xiao, M.R. Ferguson, K.E. Magee // *J Lipid Res.* – 2013. – Vol. 54(2). – P. 514-521. doi: 10.1194/jlr.M034066.
133. Koerner, C.M. Endoplasmic reticulum quality control in lipoprotein metabolism / C.M. Koerner, B.S. Roberts, S.B. Neher // *Mol Cell Endocrinol.* – 2019. – Vol. 498. – P. 110547. doi: 10.1016/j.mce.2019.110547.
134. Gent, J. Low-density lipoprotein receptor structure and folding / J. Gent, I. Braakman // *Cell Mol. Life Sci.* – 2004. – V. 61. – P. 2461-70.
135. The Human Gene Mutation Database [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php> (16.10.2023)
136. Spectrum of mutations and phenotypic expression in patients with autosomal dominant hypercholesterolemia identified in Italy / S. Bertolini, L. Pisciotta, C. Rabacchi, et al. // *Atherosclerosis.* – 2013. – Vol. 227. – P. 342-348.
137. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain / L. Palacios, L. Grandoso, N. Cuevas, et al. // *Atherosclerosis.* – 2012. – Vol. 221. – P. 137-142.
138. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France / M. Marduel, A. Carrié, A. Sassolas, et al. // *Hum Mutat.* – 2010. – Vol. 31. – P. 1811-1824.
139. Founder mutations in the Netherlands: geographical distribution of the most prevalent mutations in the lowdensity lipoprotein receptor and apolipoprotein B genes / D.M. Kusters, R. Huijgen, J.C. Defesche, et al. // *Neth Heart J.* – 2011. – Vol. 19. – P. 175-182.
140. О частоте и проявлениях "литовской" мутации среди евреев с гиперлипидемией II типа и их реакции на лечение флувастатином / Липовецкий Б.М., Мандельштам М.Ю., Васильева Л.Е., и др. // *Кардиология.* – 1998. – Т. 38(5) – С. 39-41.
141. Случай семейной гиперхолестеринемии, вызванной новой мутацией D461Y в гене рецептора липопротеинов низкой плотности / С.Р. Крапивнер, П.П. Малышев, А.Б. Полтараус, и др. // *Кардиология* – 2001. – Т. 41. – С. 92-94.
142. Familial hypercholesterolemia in St-Petersburg: the known and novel mutations found in the low-density lipoprotein receptor gene in Russia / F.M. Zakharova, D.

- Damgaard, M.Y. Mandelshtam, et al. // BMC Med Genet. – 2005. – Vol. 6. – P. 6. doi: 10.1186/1471-2350-6-6.
143. Meshkov, A.N. Familial hypercholesterolemia in Russia: genetic and phenotypic characteristics / A.N. Meshkov, P.P. Malyshev, V.V. Kukharchuk // Ter Arkh. – 2009. – Vol. 81(9). – P. 23-28.
144. Verification of underlying genetic cause in a cohort of Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted next generation sequencing / A.E. Semenova, I.V. Sergienko, D. García-Giustiniani, et al. // J. Cardiovasc. Dev. Dis. – 2020. – Vol. 7. – P. 16. doi: 10.3390/jcdd7020016
145. Consensus statement of the Russian National Atherosclerosis Society (RNAS). Familial hypercholesterolemia in Russia: outstanding issues in diagnosis and management / Y.A. Karpov, V.V. Kukharchuk, S.A. Boytsov, et al. // Atheroscler. Dyslipidem. – 2015. - Vol. 2. – P. 5–15.
146. The *LDLR*, *APOB*, and *PCSK9* Variants of Index Patients with Familial Hypercholesterolemia in Russia / A. Meshkov, A. Ershova, A. Kiseleva, et al. // Genes (Basel). – 2021 – Vol. 12(1). – P. 66. doi: 10.3390/genes12010066.
147. Identification of novel variants in the *LDLR* gene in Russian patients with familial hypercholesterolemia using targeted sequencing / V.V. Miroshnikova, O.V. Romanova, O.N. Ivanova, et al. // Biomedical reports. – 2021. – Vol. 14(1). – P. 15. <https://doi.org/10.3892/br.2020.1391>.
148. “Финские” мутации в гене рецептора ЛПНП — редкая причина семейной гиперхолестеринемии в Санкт-Петербурге и Петрозаводске / Т.Ю. Комарова, А.С. Головина, Н.А. Грудина, и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 155. – №3. – С. 359-362.
149. Clinical Expression of Familial Hypercholesterolemia in clusters of mutations of *LDL*-receptor gene causing receptor-defective or receptor-negative phenotype / S. Bertolini, A. Cantafora, M. Averna, et al. // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2000. – Vol. 20. – P. 41-52.
150. Simon Broome Familial Hyperlipidaemia Register Group and Scientific Steering Committee. Genetic causes of familial hypercholesterolaemia in patients in the UK:

- relation to plasma lipid levels and coronary heart disease risk / S.E. Humphries, R.A. Whittall, C.S. Hubbart, et al. // *J Med Genet.* – 2006. – Vol. 43. – P. 943-949.
151. Impact of low-density lipoprotein receptor mutational class on carotid atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia / M. Junyent, R. Gilabert, E. Jarauta, et al. // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 208. – P. 437-441.
152. Presence and type of low-density lipoprotein receptor (LDLR) mutation influences the lipid profile and response to lipid-lowering therapy in Brazilian patients with heterozygous familial hypercholesterolemia / P.C.J.L. Santos, A.C. Morgan, C.E. Jannes, et al. // *Atherosclerosis.* – 2014. – Vol. 233. – P. 206-210.
153. *LPL* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4023> (17.01.2024).
154. Dron J.S., Genetics of Hypertriglyceridemia // J.S. Dron, R.A. Hegele. // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 455. doi:10.3389/fendo.2020.00455.
155. Lipoprotein Lipase Deficiency Arising in Type V Dyslipidemia / S. Tanaka, T. Ueno, A. Tsunemi, et al. // *Intern Med.* – 2019. – Vol. 58(2). – P. 251-257. doi: 10.2169/internalmedicine.0952-18.
156. A systematic review and meta-analysis of the relationship between lipoprotein lipase Asn291Ser variant and diseases / Y. Hu, W. Liu, R. Huang, et al. // *J Lipid Res.* – 2006. – Vol. 47(9). – P. 1908-1914. doi: 10.1194/jlr.M600108-JLR200.
157. Lipoprotein lipase gene polymorphisms as risk factors for stroke: a computational and meta-analysis / M. Nejati, M.A. Atlasi, M. Karimian, et al. // *Iran J Basic Med Sci.* – 2018. – Vol. 21(7). – P. 701-708. doi: 10.22038/IJBMS.2018.29009.7001.
158. The influence of lipoprotein lipase gene variation on postprandial lipoprotein metabolism / J. Lopez-Miranda, G. Cruz, P. Gomez, et al. // *J. Clin. Endocr. Metab.* – 2004. – Vol. 89. – P. 4721-4728.
159. Polymorphisms of lipid metabolism enzyme-coding genes in patients with diabetic dyslipidemia / A. Tetik Vardarlı, E. Harman, V. Bozok Çetintaş, et al. // *Anatol J Cardiol.* – 2017. – Vol. 17(4). – P. 313-321. doi: 10.14744/AnatolJCardiol.2016.7142.
160. Association between HindIII (rs320) variant in the lipoprotein lipase gene and the presence of coronary artery disease and stroke among the Saudi population / N.M. Bogari,

- A. Aljohani, A. Dannoun, et al. // J Biol Sci. – 2020. – Vol. 27(8). – P. 2018-2024. doi: 10.1016/j.sjbs.2020.06.029.
161. Multilocus Analysis of Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction in Russians: Replication Study / N.G. Kukava, B.V. Titov., G.J. Osmak, et al. // Acta Naturae – 2017. – Vol. 9(4). – P. 74-83. PMID: 29340220.
162. Lipoprotein lipase gene HindIII polymorphism and risk of myocardial infarction in South Indian population / P.R. Tanguturi, B. Pullareddy, B.S. Rama Krishna, et al. // Indian Heart J. – 2013. – Vol. 65(6). – P. 653-7. doi: 10.1016/j.ihj.2013.10.004
163. *SCARB1* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/949> (17.01.2024)
164. Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor / G. Valacchi, C. Sticozzi, Y. Lim, et al. // Acad Sci. – 2011. – Vol. 1229. – P. E1-7. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06205.x.
165. Scavenger receptor class B, type 1 facilitates cellular fatty acid uptake / W. Wang, Z. Yan, J. Hu, et al. // Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. – 2020. – Vol. 1865(2). – P. 158554. doi: 10.1016/j.bbalip.2019.158554.
166. Lp-PLA2, scavenger receptor class B type I gene (SCARB1) rs10846744 variant, and cardiovascular disease / A. Manichaikul, X.Q. Wang, L. Li, et al. // PLoS One. – 2018. – Vol. 13(10). – P. 0204352. doi: 10.1371/journal.pone.0204352.
167. Impact of genetic variants in human scavenger receptor class B type I (SCARB1) on plasma lipid traits / V. Niemsiri, X. Wang, D. Pirim, et al. // Circ Cardiovasc Genet. – 2014. – Vol. 7(6). – P. 838-47. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.114.000559.
168. Population-based study of SR-BI genetic variation and lipid profile / A. Morabia, B.M. Ross, M.C. Costanza, et al. // Atherosclerosis. – 2004. – Vol. 175(1). – P. 159-168. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2004.03.014.
169. Ma, R. *SCARB1* rs5888 gene polymorphisms in coronary heart disease: A systematic review and a meta-analysis / R. Ma, X. Zhu, B. Yan // Gene. – 2018. – Vol. 678. – P. 280-287. doi: 10.1016/j.gene.2018.08.024.

170. Meta-analysis of the association between SCARB1 polymorphism and fasting blood lipid levels / L.F. Ye, Y.R. Zheng, Q.G. Zhang, et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(46). – P. 81145-81153. doi: 10.18632/oncotarget.20867.
171. Galmés, S. Increased Risk of High Body Fat and Altered Lipid Metabolism Associated to Suboptimal Consumption of Vitamin A Is Modulated by Genetic Variants rs5888 (SCARB1), rs1800629 (UCP1) and rs659366 (UCP2) / S. Galmés, A. Palou, F. Serra // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 12(9). – P. 2588. doi: 10.3390/nu12092588.
172. *SREBF2* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6721> (17.01.2024)
173. Alegret, M. Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches / M. Alegret, J.S. Silvestre // *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. – 2006. – Vol. 28(9). – P. 627–656.
174. MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis / S.H. Najafi-Shoushtari, F. Kristo, Y. Li, et al. // *Science*. – 2010. – Vol. 328. – P. 1566-1569.
175. MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis / K.J. Rayner, Y. Suarez, A. Davalos, et al. // *Science* 328: 1570-1573, 2010.
176. Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production / T.K.T. Lam, A. Carpentier, G.F. Lewis, et al. // *Am J Physiol Endocrinol Metab*. – 2003. – Vol. 284. P. E863-E873.
177. SREBF1c and SREBF2 gene polymorphisms are associated with acute coronary syndrome and blood lipid levels in Mexican population / G. Vargas-Alarcon, H. Gonzalez-Pacheco, O. Perez-Mendez, et al. // *PLoS One*. – 2019. – Vol. 14(9). – P. 0222017. doi: 10.1371/journal.pone.0222017.
178. Characterization of polymorphic structure of SREBP-2 gene: role in atherosclerosis / P. Robinet, B. Védie, G. Chironi, et al. // *Atherosclerosis*. – 2003. – Vol. 168(2). – P. 381-387. doi: 10.1016/s0021-9150(03)00144-8.
179. Sterol-regulatory element-binding protein (SREBP)-2 contributes to polygenic hypercholesterolaemia / A.R. Miserez, P.Y. Muller, L. Barella et al. // *Atherosclerosis*. – 2002. – Vol. 164(1). – P. 15-26. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00762-6.

180. Sterol regulatory element-binding transcription factor (SREBF)-2, SREBF cleavage-activating protein (SCAP), and premature coronary artery disease in a Chinese population / Z. Chen, Z. Ding, G. Ma, et al. // *Mol Biol Rep.* – 2011. – Vol. 38(5). – P. 2895-901. doi: 10.1007/s11033-010-9951-2.
181. Interactions among genetic variants from SREBP2 activating-related pathway on risk of coronary heart disease in Chinese Han population / X. Liu, Y. Li, X. Lu, et al. // *Atherosclerosis.* – 2010. – Vol. 208(2). – P. 421-426. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.08.011.
182. Rizzo, M. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment / M. Rizzo, K. Berneis // *QJM.* – 2006. – Vol. 99(1). – P. 1-14. doi: 10.1093/qjmed/hci154.
183. Packard, C.J. Small dense low-density lipoprotein and its role as an independent predictor of cardiovascular disease / C.J. Packard // *Curr Opin Lipidol.* – 2006. – Vol. 17(4). – P. 412-417. doi: 10.1097/01.mol.0000236367.42755.c1.
184. Krauss, R.M. Lipoprotein subfractions and cardiovascular disease risk / R.M. Krauss // *Curr Opin Lipidol.* – 2010. – Vol. 21(4). – P. 305-11. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833b7756.
185. Hirayama, S. Small dense LDL: An emerging risk factor for cardiovascular disease / S. Hirayama, T. Miida // *Clin Chim Acta.* – 2012. – Vol. 414. – P. 215-24. doi: 10.1016/j.cca.2012.09.010.
186. Qiao Y.N., Low-density lipoprotein particles in atherosclerosis / Y.N. Qiao, Y.L. Zou, S.D. Guo. // *Front Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 931931. doi:10.3389/fphys.2022.931931.
187. Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases / E.A. Ivanova, V.A. Myasoedova, A.A. Melnichenko, et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 1273042. doi: 10.1155/2017/1273042.
188. Two subpopulations of intermediate density lipoprotein and their relationship to plasma triglyceride and cholesterol levels / B.J. Meyer, M.J. Caslake, M.M. McConnell, et al. // *Atherosclerosis.* – 2000. – Vol. 153(2). – P. 355-362. doi: 10.1016/s0021-9150(00)00408-1.

189. Modified low density lipoprotein and lipoprotein-containing circulating immune complexes as diagnostic and prognostic biomarkers of atherosclerosis and type 1 diabetes macrovascular disease / A.N. Orekhov, Y.V. Bobryshev, I.A. Sobenin, et al. // *Int J Mol Sci.* – 2014. – Vol. 15(7) – P. 12807-12841. doi: 10.3390/ijms150712807.
190. Pietzsch, J. Oxidation of apolipoprotein B-100 in circulating LDL is related to LDL residence time. In vivo insights from stable-isotope studies / J. Pietzsch, P. Lattke, U. Julius // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2000. – Vol. 20(10). – P. 63-67. doi: 10.1161/01.atv.20.10.e63.
191. Clinical guidelines for familial hypercholesterolemia / M.V. Ezhov, S.S. Bazhan, A.I. Ershova, et al. // *Ateroskleroz.* – 2019. – Vol. 15. – P. 58–98. doi:10.15372/ATER20190108.
192. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus statement of the European Atherosclerosis Society / B.G. Nordestgaard, M.J. Chapman, S.E. Humphries, et al. // *Eur. Heart J.* – 2013. – Vol. 34. – P. 3478–3490. doi:10.1093/eurheartj/ehz273.
193. Homozygous autosomal dominant hypercholesterolemia in the Netherlands: Prevalence, genotype–phenotype relationship, and clinical outcome / B. Sjouke, D.M. Kusters, I. Kindt, et al. // *Eur. Heart J.* – 2015. Vol. 36. – P. 560–565. doi:10.1093/eurheartj/ehu058.
194. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: Pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel / J. Borén, M.J. Chapman, R.M. Krauss, et al. // *Eur. Heart J.* – 2020. – Vol. 41. – P. 2313–2330. doi:10.1093/eurheartj/ehz962.
195. International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: A consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel / R.D. Santos, S.S. Gidding, R.A. Hegele,

et.al. // *Lancet Diabetes Endocrinol* – 2016. – Vol. 4. – P. 850–861. doi:10.1016/S2213–858730041–9.

196. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: Gaining decades of life by optimizing detection and treatment / A. Wiegman, S.S. Gidding, G.F. Wattset, al. // *Eur. Heart J.* – 2015. – Vol. 36. – P. 2425–2437, doi:10.1093/eurheartj/ehv157.

197. Wiegman, A. Lipid Screening, Action, and Follow-up in Children and Adolescents / A. Wiegman // *Curr Cardiol. Rep.* – 2018. – Vol. 20, - P. 80. doi:10.1007/s11886–018–1014–7.

198. Diagnosis of familial hypercholesterolemia in general practice using clinical diagnostic criteria or genetic testing as part of cascade genetic screening / T.P. Leren, T.H. Finborud, T.E. Manshaus, et al. // *Community Genet.* – 2008. – Vol. 11. – P. 26–35. doi:10.1159/000111637.

199. Working Group by Japan Atherosclerosis Society for Making Guidance of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia 2017 / M. Harada-Shiba, H. Arai, Y. Ishigaki, et al. // *Atheroscler Thromb.* – 2018. – Vol. 25(8). – P. 751–770. doi: 10.5551/jat.CR003.

200. Di Taranto, M.D. Familial hypercholesterolemia: A complex genetic disease with variable phenotypes / M.D. Di Taranto, C. Giacobbe, G. Fortunato // *Eur J. Med. Genet.* – 2020. – Vol. 63. – P. 103831. doi:10.1016/j.ejmg.2019.103831.

201. Berberich, A.J. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia / A.J. Berberich, R.A. Hegele // *Nat. Rev. Cardiol.* – 2019. – Vol. 16. 9–20. doi:10.1038/s41569–018–0052–6.

202. Clinical Guidelines and Evidence Review for Familial hypercholesterolaemia: the identification and management of adults and children with familial hypercholesterolaemia / K. De Mott, L. Nherera, E.J. Shaw, et al. – London: London: National Institute for Health and Care Excellence (NICE), 2008 – P. 35. ISBN-13:978-1-4731-1290-2

203. Leren, T.P. Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia / T.P. Leren // *Clin Genet* – 2004. – Vol. 66. – P. 483–487.

204. Controversies in familial hypercholesterolemia: recommendations of the NICE Guideline Development Group for the identification and management of familial hypercholesterolemia / R. Minhas, S.E. Humphries, N. Qureshi, et al. // Heart – 2009. – Vol. 95. – P. 584-587.
205. Familial hypercholesterolemia in children and adolescents: a new pediatric model of care / A.C. Martin, J. Coakley, D.A. Forbes, et al. // Pediatric Child Health. – 2013. – Vol. 9 (4). – P. 263-272.
206. Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease / M. Abifadel, J.P. Rabes, M. Devillers, et al. // Hum Mutat. – 2009. – Vol. 30. – P. 520–529.
207. Schulz, R. Molecular and cellular function of the proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) / R. Schulz, K.-D. Schluter, U. Laufs // Basic Res Cardiol. – 2015. – Vol. 110. – P. 4.
208. Najam, O. Familial Hypercholesterolemia: a Review of the Natural History, Diagnosis, and Management / O. Najam, K.K. Ray // CardiolTher. – 2015. – Vol. 4. – P. 25–38.
209. Choi, S. Proprotein convertases in high-density lipoprotein metabolism / S. Choi, R. Korstanje // Biomarker Research. – 2013. – Vol. 1. P. 27.
210. Relation of plasma PCSK9 levels to lipoprotein subfractions in patients with stable coronary artery disease / X. Rui-Xia, L. Sha, Z. Yan, et al. // Lipids in Health and Disease. – 2014. – Vol. 13. – P. 188.
211. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease / J.C. Cohen, E. Boerwinkle, T.H. Mosley, et al. // N Engl J Med. – 2006. Vol. - 354. – P. 1264–1272.
212. Longitudinal association of PCSK9 sequence variations with low-density lipoprotein cholesterol levels: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study / Huang C.C., Fornage M., Lloyd-Jones D.M. et al. // CircCardiovasc Genet. - 2009. – Vol. 2(4). – P. 354–361.

213. Molecular characterization of loss-of-function mutations in PCSK9 and identification of a compound heterozygote / Z. Zhao, Y. Tuakli-Wosornu, T.A. Lagace, et al. // *Am J Hum Genet.* – 2006. – Vol. 79. – P. 514-523.
214. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities / M. Mbikay, F. Sirois, J. Mayne, et al. // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 701–706.
215. Duff, C.J. PCSK9: an emerging target for treatment of hypercholesterolemia / C.J. Duff, N.M. Hooper // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* – 2011. – Vol. 15. – P. 157–168.
216. Association of common DNA sequence variants at 33 genetic loci with blood lipids in individuals of African ancestry from Jamaica / R. Gupta, K. Ejebe, J. Butler, et al. // *Hum Genet.* - 2010. – Vol. 128. – P. 557–561.
217. PCSK9-deficient mice exhibit impaired glucose tolerance and pancreatic islet abnormalities / M. Mbikay, F. Sirois, J. Mayne, et al. // *FEBS Letters.* – 2010. – Vol. 584. – P. 701–706.
218. Genetic analysis of familial hypercholesterolemia in Western Australia / A.J. Hooper, L.T. Nguyen, J.R. Burnett, et al. // *Atherosclerosis.* – 2012. – Vol. 224. – P. 430-434.
219. Use of low-density lipoprotein cholesterol gene score to distinguish patients with polygenic and monogenic familial hypercholesterolemia: a case-control study / P.J. Talmud, S. Shah, R. Whittall, et al. // *Lancet.* – 2013. – Vol. 381. – P. 1293-1301.
220. FH4=STAP1. Another Gene for Familial Hypercholesterolemia? Relevance to Cascade Testing and Drug Development? / I.N.M. Day // *Circ Res.* – 2014. – Vol. 115. – P. 534-536.
221. STAP1 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/26228> (17.01.2024)
222. Isoform-dependent interaction of BRDG1 with Tec kinase / K. Yokohari, Y. Yamashita, S. Okada, et al. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2001. – Vol. 289. – P. 414-420.

223. Loops govern SH2 domain specificity by controlling access to binding pockets / T. Kaneko, H. Huang B. Zhao, et al. // *Sci Signal.* – 2010. – Vol. 3(120). – P. 34. doi: 10.1126/scisignal.2000796.
224. Identifying leukocyte gene expression patterns associated with plasma lipid levels in human subjects / J. Ma, A.A. Dempsey, D. Stamatou, et al. // *Atherosclerosis.* – 2007. – Vol. 191(1). – P. 63-72.
225. Mutations in STAP1 are associated with autosomal dominant hypercholesterolemia / S.W. Fouchier, G.M. Dallinga-Thie, J.C. Meijers, et al. // *Circ Res.* – 2014. – Vol. 115(6). – P. 552-555. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.304660.
226. Systematic analysis of variants related to familial hypercholesterolemia in families with premature myocardial infarction / I. Brønne, M. Kleinecke, B. Reiz, et al. // *Eur J Hum Genet.* – 2016. – Vol. 24(2). – P. 191-197. doi: 10.1038/ejhg.2015.100.
227. Genetically Confirmed Familial Hypercholesterolemia in Patients With Acute Coronary Syndrome / A. Amor-Salamanca, S. Castillo, E. Gonzalez-Vioque et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2017. – Vol. 70(14). – P. 1732-1740. doi: 10.1016/j.jacc.2017.08.009.
228. Rare STAP1 mutation incompletely associated with familial hypercholesterolemia / F. Blanco-Vaca, J.M. Martín-Campos, A. Pérez, et al. // *Clin Chim Acta.* – 2018. – Vol. 487. – P. 270-274. doi: 10.1016/j.cca.2018.10.014.
229. Application of expanded genetic analysis in the diagnosis of familial hypercholesterolemia in patients with very early-onset coronary artery disease / Y.X. Cao, N.Q. Wu, D. Sun, et al. // *J Transl Med.* – 2018. – Vol. 16(1). – P. 345. doi: 10.1186/s12967-018-1737-7.
230. Variants in signal transducing adaptor family member 1 (STAP1) do not affect LDL-cholesterol / M. Hartgers, R. Reeskamp, M. Winkelmeijer, et al. // *Atherosclerosis.* – 2019. – Vol. 287. – P. e22ee122. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.229>.
231. Evaluation of the role of STAP1 in Familial Hypercholesterolemia / M. Danyel, C.E. Ott, T. Grenkowitz, et al. // *Scientific Reports.* – 2019. – Vol. 9. - P. 11995. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48402-y>

232. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine / I. Kim, S.H. Ahn, T. Inagaki, et al. // *Journal of Lipid Research*. – 2007. – Vol. 48(12). – P. 2664–2672. doi:10.1194/jlr.M700330-JLR200.
233. Multiple genetic determinants of plasma lipid levels in Caribbean Hispanics / Y. Liao, H.F. Lin, T. Rundek, et al. // *Clin Biochem*. – 2008. – Vol. 41(4-5). – P. 306-312.
234. CYP7A1 Gene Polymorphism Located in the 5' Upstream Region Modifies the Risk of Coronary Artery Disease / T.A. Iwanicki, P. Balcerzyk, T. Niemiec, et al. // *Disease Markers Volume*. – 2015. – Article ID 185969. – P. 6. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/185969>
235. Genetic variants in CYP7A1 and risk of myocardial infarction and symptomatic gallstone disease / F. Qayyum, B.K. Lauridsen, R. Frikke-Schmidt, et al. // *European Heart Journal*. – 2018. – Vol. 39 (22). – P. 2106–2116. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy068>
236. Fouchier S.W. Lysosomal acid lipase A and the hypercholesterolaemic phenotype / S.W. Fouchier, J.C. Defesche // *Curr Opin Lipidol*. – 2013. – Vol. 24(4). – P. 332-338. doi: 10.1097/MOL.0b013e328361f6c6.
237. Association of LIPA gene polymorphisms with obesity-related metabolic complications among severely obese patients / F. Guénard, A. Houde, L. Bouchard, et al. // *Obesity (Silver Spring)* – 2012. – Vol. 20(10). – P. 2075-2082. doi: 10.1038/oby.2012.52.
238. Molecular and clinical characterization of a series of patients with childhood-onset lysosomal acid lipase deficiency. Retrospective investigations, follow-up and detection of two novel LIPA pathogenic variants / L. Pisciotta, G. Tozzi, L. Travaglini, et al. // *Atherosclerosis*. – 2017. – Vol. 265. – P. 124-132. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.021.
239. Prevalence of cholesteryl ester storage disease among hypercholesterolemic subjects and functional characterization of mutations in the lysosomal acid lipase gene / T. Vinje, L. Wierød, T.P. Leren // *Mol Genet Metab*. – 2018. – Vol. 123(2). – P. 169-176. doi: 10.1016/j.ymgme.2017.11.008.

240. Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups / S.A. Scott, B. Liu, I. Nazarenko, et al. // *Hepatology*. – 2013. – Vol. 58. – P. 958–965.
241. Cholesteryl ester storage disease: Review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease / D.L. Bernstein, H. Hülkova, M.G. Bialer, et al. // *Journal of Hepatology*. – 2013. – Vol. 58 (6). – P. 1230-1243.
242. Identification and metabolic profiling of patients with lysosomal acid lipase deficiency / C.R. Pullinger, E.O. Stock, I. Movsesyan, et al. // *J. Clin. Lipidol.* – 2015. – Vol. 9. – P. 716-726.
243. Sequencing for LIPA mutations in patients with a clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia / B. Sjouke, J.C. Defesche, J.S.E. de Randamie, et al. // *Atherosclerosis*. – 2016. – Vol. 251. – P. 263-265.
244. Lysosomal acid lipase deficiency: a hidden disease among cohorts of familial hypercholesterolemia? / J.R. Chora, A.C. Alves, A.M. Medeiros, et al. // *J. Clin. Lipidol.* 2017. – Vol. 11. – P. 477-484.
245. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters / K.E. Berge, H. Tian, G.A. Graf, et al. // *Science*. – 2000. – Vol. 290(5497). – P. 1771-1775.
246. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption / M.H. Lee, K. Lu, S. Hazard, et al. // *Nat Genet.* – 2001. – Vol. 27(1). – P. 79-83.
247. Cooperative transcriptional activation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 genes by nuclear receptors including Liver-X-Receptor / S.S. Back, J. Kim, D. Choi, et al. // *BMB Rep.* – 2013. – Vol. 46(6). – P. 322-327.
248. *ABCG5* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ABCG5> (18.01.2024)
249. *ABCG8* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=ABCG8> (18.01.2024)

250. Structural snapshot of the cholesterol-transport ATP-binding cassette proteins / B.M. Xavier, W.J. Jennings, A.A. Zein, et al. // *Biochem Cell Biol.* – 2019. – Vol. 97(3). – P. 224-233. doi: 10.1139/bcb-2018-0151.
251. Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8 / J.Y. Lee, L.N. Kinch, D.M. Borek, et al. // *Nature.* – 2016. – Vol. 533(7604). – P. 561-564. doi: 10.1038/nature17666.
252. The ABCG8 G574R variant, serum plant sterol levels, and cardiovascular disease risk in the Old Order Amish / R.B. Horenstein, B.D. Mitchell, W.S. Post, et al. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2013. – Vol. 33(2). – P. 413-419. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.245480.
253. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis / X.H. Yu, K. Qian, N. Jiang, et al. // *Clin Chim Acta.* – 2014. – Vol. 428. – P. 82-88. doi: 10.1016/j.cca.2013.11.010.
254. Genetic variations at ABCG5/G8 genes modulate plasma lipids concentrations in patients with familial hypercholesterolemia / A. Garcia-Rios, P. Perez-Martinez, F. Fuentes, et al. // *Atherosclerosis.* – 2010. Vol. 210(2). – P. 486-492. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2010.01.010
255. ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols / I. Lamiquiz-Moneo, L. Baila-Rueda, A.M. Bea, et al. // *J Clin Lipidol.* – 2017. – Vol. 11(6). – P. 1432-1440. doi: 10.1016/j.jacl.2017.09.005.
256. Frequencies of four ATP-binding cassette transporter G8 polymorphisms in patients with ischemic vascular diseases / A. Szilvási, H. Andrikovics, E. Pongrácz, et al. // *Genet Test Mol Biomarkers.* – 2010. – Vol. 14(5). – P. 667-672. doi: 10.1089/gtmb.2010.0035.
257. Characterization of the human patatin-like phospholipase family / P.A. Wilson, S.D. Gardner, N.M. Lambie, et al. // *J Lipid Res.* – 2006. – Vol. 47(9). – P. 1940-1949.
258. Whole-exome sequencing identifies rare and low-frequency coding variants associated with LDL cholesterol / L.A. Lange, Y. Hu, H. Zhang, et al. // *Am J Hum Genet.* – 2014. – Vol. 94(2). – P. 233-245. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.01.010.

259. Convened by the Familial Hypercholesterolemia Foundation. Clinical genetic testing for familial hypercholesterolemia: JACC Scientific Expert Panel / A.C. Sturm, J.W. Knowles, S.S. Gidding, et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2018. – Vol. 72. – P. 662–680. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.044>.
260. Diagnostic yield and clinical utility of sequencing familial hypercholesterolemia genes in patients with severe hypercholesterolemia / A.V. Khera, H.H. Won, G.M. Peloso, et al. // *J Am Coll Cardiol.* – 2016. – Vol. 67. – P. 2578–2589. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.03.520.
261. Toward a new clinical classification of patients with familial hypercholesterolemia: One perspective from Spain / L. Masana, D. Ibarretxea, C. Rodríguez-Borjabada, et al. // *Atherosclerosis.* – 2019. – Vol. 287. – P. 89–92. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.905>.
262. Сравнительный анализ экспрессии генов в клетках сосудов у больных с клинически выраженным атеросклерозом / М.С. Назаренко, А.В. Марков., А.А. Слепцов, и др. // *Биомедицинская химия.* – 2018. – Т. 64 (5). – С. 416-422. DOI: 10.18097/PBMC20186405416.
263. Анализ уровня метилирования гена MIR21 в сосудах и лейкоцитах крови при атеросклерозе сонных артерий методом таргетного бисульфитного секвенирования / Ю.А. Королёва, А.В. Марков, А.А. Слепцов, и др. // *Медицинская генетика.* – 2020. – Т. 19(5). – С. 41-43. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.05.41-43>.
264. Современные аспекты молекулярно-генетической диагностики дислипидемий / Н.Р. Валиахметов, А.В. Зайцева, Д.Б. Эрдынеева и др. // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* – 2019. – Т. 8 (S3-2). – С. 12-12. <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41420608>.
265. Оценка общего уровня метилирования ДНК по метилированию ретротранспозона LINE-1 при атеросклерозе у человека / А.В. Марков, В.В. Серебрякова, М.С. Назаренко, и др. // *Медицинская генетика.* – 2018. – Т. 17. – № 3(189). – С. 13-17. <https://elibrary.ru/item.asp?id=32660683>.

266. Соматический мозаицизм и структурная вариабельность гена GBP3 при атеросклерозе / А.А. Слепцов, М.С. Назаренко, А.В. Зайцева и др. // Атеросклероз. – 2019. – Т. 15. – № 4. – С. 46-51. <https://doi.org/10.15372/ATER20190404>.
267. Omics-based approaches to understand mechanosensitive endothelial biology and atherosclerosis / R.D. Simmons, S. Kumar, S.R. Thabet, et al. // Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. – 2016. – Vol. 8(5). – P. 378-401. doi: 10.1002/wsbm.1344.
268. Simmons, R.D. The role of endothelial mechanosensitive genes in atherosclerosis and omics approaches / R.D. Simmons, S. Kumar, H. Jo // Arch Biochem Biophys. – 2016. – Vol. 591. – P. 111-131. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.005.
269. Imaging plaques to predict and better manage patients with acute coronary events / H.M. Garcia-Garcia, I.K. Jang, P.W. Serruys, et al. // Circ Res. – 2014. – Vol. 114. – P. 1904-1917. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302745>
270. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression / A. Millon, E. Canet-Soulas, L. Boussel, et al. // Vascular. – 2014. – Vol. 22. – P. 221-237. <https://doi.org/10.1177/1708538113478758>.
271. Mechanisms of plaque formation and rupture / J.F. Bentzon, F. Otsuka, R. Virmani, et al. // Circ. Res. – 2014. – Vol. 114. – P. 1852–1866. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302721>
272. Differentially expressed genes and canonical pathway expression in human atherosclerotic plaques – Tampere Vascular Study / M. Sulkava, E. Raitoharju, M. Levula, et al. // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 41483. doi: 10.1038/srep41483.
273. Genes involved in systemic and arterial bed dependent atherosclerosis – Tampere Vascular study / M. Levula, N. Oksala, N. Airla, et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – P. e33787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033787>.
274. Study of the activated macrophage transcriptome / V.V. Novoselov, M.A. Sazonova, E.A. Ivanova, et al. // Exp Mol Pathol. – 2015. – Vol. 99(3). – P. 575-580. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.09.014.
275. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation / J. Xue, S.V. Schmidt, J. Sander, et al. // Immunity. – 2014. – Vol. 40(2). – P. 274-288. doi: 10.1016/j.immuni.2014.01.006.

276. Coronary artery endothelial transcriptome in vivo: identification of endoplasmic reticulum stress and enhanced reactive oxygen species by gene connectivity network analysis / M. Civelek, E. Manduchi, R.J. Riley, et al. // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2011. – Vol. 4(3). – P. 243-252. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958926.
277. Gene expression signatures, pathways and networks in carotid atherosclerosis / L. Perisic, S. Aldi, Y. Sun, et al. // *J Intern Med.* – 2016. – Vol. 279(3). – P. 293-308. doi: 10.1111/joim.12448.
278. Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: Rationale and Design of the HAPIEE study / A. Peasey, M. Bobak, R. Kubinova, et al. // *BMC Public Health* – 2006. – Vol. 6. – P. 255-264. doi: 10.1186/1471-2458-6-255.
279. GAS Power Calculator [Электронный ресурс]. – URL: http://csg.sph.umich.edu/abecasis/gas_power_calculator/index.html (16.10.2023).
280. WHO—Human genetics DoNDP. Familial hypercholesterolaemia—report of a second WHO consultation, Ed. Geneva: WHO; 1999 [Электронный ресурс]. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66346> (19.10.2023).
281. Рагино, Ю.И. Стадии развития атеросклеротического очага и типы нестабильных бляшек – патофизиологическая и гистологическая характеристика / Ю.И. Рагино, А.М. Волков, А.М. Чернявский // *Российский кардиологический журнал.* – 2013. – Vol. 5(103). – P. 88–95. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2013-5-88-95>.
282. Sambrook, J. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform / J. Sambrook, D.W. Russell // *CSH Protoc.* – 2006. – Vol. 2006(1). – P. 4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455.
283. Поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, методами полногеномного секвенирования и машинного обучения / Д.Е. Иванощук, А.Б. Колкер, О.В. Тимощенко, и др. // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2023. – Т. 27(5). – С. 522-529. DOI 10.18699/VJGB-23-63.

284. Программа построения решающих правил для прогнозирования семейной гиперхолестеринемии на основе машинного обучения и секвенирования нового поколения / А.Б. Колкер, Е.В. Шахтшнейдер, Д.Е. Иванощук, и др. // Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2023660511, 22.05.2023. Заявка № 2023618558 от 02.05.2023.
285. База данных ансамбля деревьев для прогнозирования семейной гиперхолестеринемии на основе машинного обучения и секвенирования нового поколения / А.Б. Колкер, Е.В. Шахтшнейдер, Д.Е. Иванощук, и др. // Свидетельство о регистрации базы данных 2022623708, 27.12.2022. Заявка № 2022623680 от 14.12.2022.
286. Платформа NGS Wizard [Электронный ресурс]. – URL: <https://genomenal.ru/> (16.10.2023).
287. CADD [Электронный ресурс]. – URL: <https://cadd.gs.washington.edu/snv> (19.10.2023).
288. PolyPhen2 [Электронный ресурс]. – URL: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (19.0.2023).
289. MutationTaster [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.mutationtaster.org/> (19.10.2023).
290. GnomAD [Электронный ресурс]. – URL: <https://gnomad.broadinstitute.org> (12.10.2023).
291. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale, et al. // Genet Med. – 2015. – Vol. 17. – P. 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>.
292. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets / D. Szklarczyk, A.L. Gable, D. Lyon, et al. // Nucleic Acids Res. – 2019. – Vol. 47. – P. D607-D613. doi:10.1093/nar/gky1131.
293. Burrow–Wheeler Alignment tool (BWA v.0.7.17) [Электронный ресурс]. – URL: <http://bio-bwa.sourceforge.net/> (12.10.2023).

294. dbNSFP [Электронный ресурс]. – URL: <https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP> (12.10.2023).
295. SIFT [Электронный ресурс]. – URL: <http://sift.jcvi.org/> (12.10.2023).
296. PROVEAN [Электронный ресурс]. – URL: <http://provean.jcvi.org/index.php> (12.10.2023).
297. PubMed [Электронный ресурс]. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov> (16.10.2023).
298. Human Gene Mutation Database (HGMD®): 2003 update / P.D. Stenson, E.V. Ball, M. Mort, et al. // Hum. Mutat. – 2003. – Vol. 21. – P. 577-581. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>.
299. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence / M.J. Landrum, J.M. Lee, M. Benson, et al. // Nucleic Acids Research. – 2018. – Vol. 46 (D1). – P. D1062–D1067. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1153>.
300. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases / I.F. Fokkema, P.E. Taschner, G.C. Schaafsma, et al. // Hum Mutat. – 2011. – Vol. 32(5). – P. 557-563.
301. 1000 Genomes [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.internationalgenome.org/> (12.10.2023).
302. Бююль, А. SPSS: Искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей / Бююль А., Цёфель П. — СПб.: ДиаСофтЮП, 2005. – 608 с.
303. Peacock, J.L. Oxford Handbook of Medical Statistics. Second Edition. / Peacock J.L., Peacock Ph.J. – Oxford University Press, 2020. – 640 P. ISBN: 9780198743583.
304. Этногенетические особенности подверженности атеросклерозу в этнических группах Сибири (на примере гена аполипопротеина E) / М.И. Воевода, В.А. Степанов, А.Г. Ромащенко, и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – Т. 120. – №2. – С. 63-72.
305. The effect of apolipoprotein E polymorphism on serum metabolome - a population-based 10-year follow-up study / J.P. Karjalainen, N. Mononen, N. Hutri-Kähönen, et al. // Sci. Rep. – 2019. – Vol. 9(1). – P. 458. doi: 10.1038/s41598-018-36450-9.

306. New evidence from plasma ceramides links apoE polymorphism to greater risk of coronary artery disease in Finnish adults / J.P. Karjalainen, N. Mononen, N. Hutri-Kähönen, et al. // *J. Lipid Res.* – 2019. – Vol. 60(9). – P. 1622-1629. doi: 10.1194/jlr.M092809.
307. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank / A.L. Lumsden, A. Mulugeta, A. Zhou, et al. // *EBioMedicine.* – 2020. – Vol. 59. – P. 102954:1-102954:11. doi: 10.1016/j.ebiom.2020.102954.
308. E2-CHARGE investigators. The impact of APOE genotype on survival: Results of 38,537 participants from six population-based cohorts (E2-CHARGE) / F.J. Wolters, Q. Yang, M.L. Biggs, et al. // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14(7). – P. e0219668:1-e0219668:13. doi: 10.1371/journal.pone.0219668.
309. Bosnian study of APOE distribution (BOSAD): a comparison with other European populations / G. Adler, M.A. Adler, A. Urbńska, et al. // *Ann. Hum. Biol.* – 2017. – Vol. 44(6). – P. 568-573. doi: 10.1080/03014460.2017.1346708.
310. Популяционное исследование спектра мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в российской популяции / М.И. Воевода, И.В. Куликов, Е.В. Шахтштейнер, и др. // *Генетика.* – 2008. – №10. – С. 1191-1194. DOI:10.1134/S1022795408100074.
311. Мандельштам, М.Ю. Что дало изучение семейной гиперхолестеринемии для понимания генетики дислипидемий? / М.Ю. Мандельштам // *Мед. генетика.* – 2003. – Т. 2. – №12. – С. 509-519.
312. Мутации гена рецептора липопротеинов низкой плотности у пациентов с клиническим диагнозом семейной гиперхолестеринемии / Мешков А.Н., Стамбольский Д.В., Крапивнер С.Р. и др. // *Кардиология.* – 2004. – Т. 44. – № 9. – С. 58–61.
313. Генетические факторы риска развития ишемической болезни сердца у пациентов с семейной гиперхолестеринемией / А.Н. Мешков, Д.В. Стамбольский, Л.А. Никитина, и др. // *Кардиология.* – 2005. – Т. 45. – № 7. – С. 10-14.

314. Развитие ишемической болезни сердца при гетерозиготной форме семейной гиперхолестеринемии / П.П. Малышев, Т.А. Рожкова, Е.Ю. Соловьева, и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – №5. – С. 5-13.
315. SNP rs2228671 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2228671> (01.06.2021).
316. Laurie, A.D. Genetic screening of patients with familial hypercholesterolaemia (FH): a New Zealand perspective / A.D. Laurie, R.S. Scott, P.M. George. // *Atheroscler Suppl.* – 2004. – Vol. 5(5). – P. 13-15. doi: 10.1016/j.atherosclerosissup.2004.09.001.
317. SNP rs12710260 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12710260> (01.06.2021).
318. Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in German and Greek patients / G.V. Dedoussis, J. Genschel, B. Bochow, et al. // *Hum Mutat.* – 2004. – Vol. 23(3). – P. 285-286. doi: 10.1002/humu.9218.
319. Variability in assigning pathogenicity to incidental findings: insights from LDLR sequence linked to the electronic health record in 1013 individuals / M.S. Safarova, E.W. Klee, L.M. Baudhuin, et al. // *Eur J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 25(4). – P. 410-415. doi: 10.1038/ejhg.2016.193.
320. Monozygotic twins with familial hypercholesterolemia and high lipoprotein(a) levels leading to identical cardiovascular outcomes: Case report and review of the literature / M. Kayıkçıoğlu, H.G. Uzun, A. Tetik Vardarl, et al. // *Turk Kardiyol Dern Ars.* – 2020. – Vol. 48(5). – P. 531-538. English. doi: 10.5543/tkda.2020.62185.
321. SNP rs5929 [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5929> (01.06.2021).
322. The ApoE ε4 Isoform: Can the Risk of Diseases be Reduced by Environmental Factors? / M.M. Bos, R. Noordam, G.J. Blauw, et al. // *A Biol. Sci. Med. Sci.* – 2019. – Vol. 74(1) – P. 99-107. doi: 10.1093/gerona/gly226.
323. Song, Y. Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease / Y. Song, M.J. Stampfer, S. Liu // *Ann. Intern. Med.* – 2004. – Vol. 141(2). – P. 137-147. doi: 10.7326/0003-4819-141-2-200407200-00013.

324. Lipoprotein Lipase S447X a Naturally Occurring Gain-of-Function Mutation / J. Rip, M.C. Nieman, C.J. Ross, et al. // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2006. – V. 26. – P. 1236-1245.
325. Gender differences in LDL and HDL subfractions in atherogenic and nonatherogenic phenotypes / I. Zitnanova, S. Oravec, M. Janubova, et al. // *J Clin Biochem*. – 2020. – Vol. 79. – P. 9-13. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2020.02.002.
326. Рагино, Ю.И. Мелкие плотные субфракции липопротеинов низкой плотности и атерогенез / Ю.И. Рагино // *Российский кардиологический журнал*. – 2004. – Т. 4. – С. 84-90.
327. LDL and HDL subfractions, dysfunctional HDL: treatment options / A. Garcia-Rios, D. Nikolic, P. Perez-Martinez et al. // *Curr Pharm Des*. – 2014. – Vol. 20(40). – P. 6249-6255. doi: 10.2174/1381612820666140620154014.
328. Khosravi, M. Circulating low density lipoprotein (LDL) / M. Khosravi, R. Hosseini-Fard, M. Najafi // *Horm Mol Biol Clin Investig*. – 2018. – Vol. 35(2). – P. 0024. doi: 10.1515/hmbci-2018-0024.
329. Zhang, X. Transport of LDLs into the arterial wall: impact in atherosclerosis / X. Zhang, C. Fernández-Hernando // *Curr Opin Lipidol*. – 2020. – Vol. 31(5). – P. 279-285. doi: 10.1097/MOL.0000000000000701.
330. Human triacylglycerol-rich lipoprotein subfractions as substrates for lipoprotein lipase / R.M. Fisher, S.W. Coppack, S.M. Humphreys, et al. // *Clin Chim Acta*. – 1995. – Vol. 236(1). – P. 7-17.
331. Nakajima, K. Postprandial remnant lipoproteins as targets for the prevention of atherosclerosis / K. Nakajima, A. Tanaka // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. – 2018. – Vol. 25(2) – P. 108-117. doi: 10.1097/MED.0000000000000393.
332. Homozygous familial hypercholesterolemia: the c.1055G>A mutation in the LDLR gene and clinical heterogeneity / M.T. Magaña Torres, S. Mora-Hernández, N.A. Vázquez Cárdenas, et al. // *J Clin Lipidol*. – 2014. – Vol. 8(5). – P. 525-527. doi: 10.1016/j.jacl.2014.05.002.
333. Feussner, G. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of the human apolipoprotein E2 (Arg136-->Cys) variant / G. Feussner, M. Albanese, A.

- Valencia // *Atherosclerosis*. – 1996. – Vol. 126(2). – P. 177-84. doi: 10.1016/0021-9150(96)05870-4.
334. Genetic-epidemiological evidence on genes associated with HDL cholesterol levels: a systematic in-depth review / E. Boes, S. Coassin, B. Kollerits, et al. // *ExpGerontol*. – 2009. – Vol. 44(3). – P. 136-160.
335. Mutual effect of rs688 and rs5925 in regulating low-density lipoprotein receptor splicing / J.D. Lee, K.M. Hsiao, T.C. Wang, et al. // *DNA Cell Biol*. – 2014. – Vol. 33(12). – P. 869-875.
336. Compound Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Caused by LDLR Variants / H. Pamplona-Cunha, M.F. Medeiros, T.C.M. Sincero, et al. // *Arq Bras Cardiol*. – 2020. – Vol. 115(3). – P. 587-589. doi: 10.36660/abc.20190582.
337. SPANR [Электронный ресурс]. – URL: <http://tools.genes.toronto.edu/> (01.06.2021).
338. Meshkov, A.N. Familial hypercholesterolemia in Russia: genetic and phenotypic characteristics / A.N. Meshkov, P.P. Malyshev, V.V. Kukharchuk // *Ter Arkh*. – 2009. – Vol. 81(9). – P. 23-28.
339. Diagnosis of heterozygous familial hypercholesterolemia. DNA analysis complements clinical examination and analysis of serum lipid levels / P.V. Koivisto, U.M. Koivisto, T.A. Miettinen, et al. // *Arterioscler Thromb*. – 1992. – Vol. 12(5). – P. 584-92. doi: 10.1161/01.atv.12.5.584.
340. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100 / L.F. Soria, E.H. Ludwig, H.R. Clarke, et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1989. – Vol. 86(2). – P. 587-591. doi: 10.1073/pnas.86.2.587.
341. Familial ligand-defective apolipoprotein B: identification of a new mutation that decreases LDL receptor binding affinity / C.R. Pullinger, L.K. Hennessy, J.E. Chatterton, et al. // *J. Clin. Invest*. – 1995. – Vol. 95. – P. 1225-1234.
342. Vega, G. L. In vivo evidence for reduced binding of low-density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia / G.L. Vega, S.M. Grundy // *J. Clin. Invest*. – 1986 – Vol. 78. – P. 1410-1414.

343. Genetic variability in the absorption of dietary sterols affects the risk of coronary artery disease / A. Helgadottir, G. Thorleifsson, K.F. Alexandersson, et al. // Eur. Heart J. – 2020. – Vol. 41. – P. 2618–2628. doi:10.1093/eurheartj/ehaa531.
344. Loss-of-Function Mutations in APOC3 and Risk of Ischemic Vascular Disease / A.B. Jorgensen, R. Frikke-Schmidt, B.G. Nordestgaard, et al. // N. Engl. J. Med. – 2014. – Vol. 371. – P. 32–41. doi:10.1056/NEJMoa1308027.
345. Mutations in LPL, APOC2, APOA5, GPIHBP1 and LMF1 in patients with severe hypertriglyceridaemia / R.P. Surendran, M.E. Visser, S. Heemelaar, et al. // J. Intern. Med. – 2012. – Vol. 272. – P. 185–196. doi:10.1111/j.1365–2796.2012.02516.x.
346. Recurrent missense mutations at the first and second base of codon Arg243 in human lipoprotein lipase in patients of different ancestries / Y. Ma, M.S. Liu, D. Chitayat, et al. // Hum. Mutat. – 1994. – Vol. 3. – P. 52–58. doi:10.1002/humu.1380030109.
347. *SIDT1* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54847> (19.10.2023).
348. *LRP1B* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53353> (19.10.2023).
349. *PLD1* [Электронный ресурс]. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5337> (19.10.2023).
350. The molecular basis of leukocyte adhesion involving phosphatidic acid and phospholipase D / F. Speranza, M. Mahankali, K.M. Henkels, et al. // J Biol Chem. 2014;289(42):28885-97. doi: 10.1074/jbc.M114.597146.
351. Congenital valvular defects associated with deleterious mutations in the PLD1 gene / A. Ta-Shma, K. Zhang, E. Salimova, et al. // J Med Genet. – 2017. – Vol. 54(4). – P. 278-286. doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104259.
352. Biallelic loss-of-function variants in PLD1 cause congenital right-sided cardiac valve defects and neonatal cardiomyopathy / N. Lahrouchi, A.V. Postma, C.M. Salazar, et al. // J Clin Invest. – 2021. – Vol. 131(5). – P. e142148. doi: 10.1172/JCI142148.
353. Association of *CETP* Gene Variants with Risk for Vascular and Nonvascular Diseases Among Chinese Adults / I.Y. Millwood, D.A. Bennett, M.V. Holmes, et al. // JAMA Cardiol. – 2018. – Vol. 3(1). – P. 34-43. doi: 10.1001/jamacardio.2017.4177.

354. The loss-of-function mutation of *CETP* affects HDLc levels but not ApoA1 in patients with acute myocardial infarction / W. Li, X. Liu, C. Huang, et al. // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2021. – Vol. 31(2). – P. 602-607. doi: 10.1016/j.numecd.2020.10.019.
355. Oliveira H.C.F. Cholesteryl Ester Transfer Protein and Lipid Metabolism and Cardiovascular Diseases. Lipid Transfer in Lipoprotein Metabolism and Cardiovascular Disease / H.C.F. Oliveira, H.F. Raposo // *Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2020. – Vol. 1276. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6082-8_2.
356. Target sequencing in patients with clinically diagnosed hereditary lipid metabolism disorders and acute coronary syndrome / A.O. Averkova, V.A. Brazhnik, G.I. Speshilov, et al. // *Bulletin of the Russian State Medical University.* – 2020. – Vol. 5. – P. 93-99. Doi: 10.24075 / vrgmu.2018.061/.
357. Molecular Genetic Approach and Evaluation of Cardiovascular Events in Patients with Clinical Familial Hypercholesterolemia Phenotype from Romania / C.-E. Vlad, L.G. Foia, R. Popescu, et al. // *J. Clin. Med.* – 2021. – Vol. 10. – P. 1399. doi: 10.3390/jcm10071399.
358. Genetic Identification for Non-Communicable Disease: Findings from 20 Years of the Tehran Lipid and Glucose Study / M.S. Daneshpour, M. Hedayati, B. Sedaghati-Khayat et al. // *Int J Endocrinol Metab.* – 2018. – Vol. 16(4 Suppl). – P. e84744. doi: 10.5812/ijem.84744.
359. GEO (Gene Expression Omnibus, NCBI) [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> (10.11.2021).
360. Association between plaque echogenicity and embolic material captured in filter during protected carotid angioplasty and stenting / T.G. Giannakopoulos, K. Moulakakis, G.S. Sfyroeras, et al. // *Eur J Vasc Endovasc Surg.* – 2012. – Vol. 43(6). – P. 627-631. doi: 10.1016/j.ejvs.2012.03.004.
361. Hypercholesterolemia and cardiovascular disease: Focus on high cardiovascular risk patients / G.F. Watts, A.L. Catapano, L. Masana, et al. // *Atherosclerosis Supplements.* – 2020. – Vol. 42. – P. e30-e34. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2021.01.006>.

362. Sharma K. Genetics of Dyslipidemia and Ischemic Heart Disease / K. Sharma, R.R. Baliga // *Curr Cardiol Rep.* – 2017. – Vol. 19(5). – P. 46. doi: 10.1007/s11886-017-0855-9. PMID: 28429242.
363. Why does Russia have such high cardiovascular mortality rates? Comparisons of blood-based biomarkers with Norway implicate non-ischaemic cardiac damage / O. Lakunchykova, M. Averina, T. Wilsgaard, et al. // *J Epidemiol Community Health.* – 2020. – Vol. 74(9). – P. 698-704. doi: 10.1136/jech-2020-213885.
364. Apolipoprotein E variation at the sequence haplotype level: implications for the origin and maintenance of a major human polymorphism / S.M. Fullerton, A.G. Clark, K.M. Weiss, et al. // *Am J Hum Genet.* – 2000. – Vol. 67(4). – P. 881-900. doi: 10.1086/303070.
365. CETP gene polymorphism in the caucasian population of West Siberia and in groups contrast by total serum cholesterol levels / E.V. Shakhtshneider, I.V. Kulikov, V.N. Maksimov, et al. // *Bull Exp Biol Med.* – 2014. – Vol. 157(3). – P. 364-367. doi: 10.1007/s10517-014-2567-0.
366. Forty-three loci associated with plasma lipoprotein size, concentration, and cholesterol content in genome-wide analysis / D.I. Chasman, G. Paré, S. Mora, et al. // *PLoS Genet.* – 2009. – Vol. 5(11). – P. e1000730. doi: 10.1371/journal.pgen.1000730.
367. «Калькулятор СГХС» [Электронный ресурс]. – URL: <https://lipidcenter.iimed.ru/o-lipidnom-tsentre/calc.html> (16.10.2023).
368. Tanguy E. Protein-Phospholipid Interaction Motifs: A Focus on Phosphatidic Acid / E. Tanguy, N. Kassas, N. Vitale // *Biomolecules.* – 2018. – Vol. 8(2). – P. 20. doi: 10.3390/biom8020020.
369. Phospholipase D1-generated phosphatidic acid modulates secretory granule trafficking from biogenesis to compensatory endocytosis in neuroendocrine cells / E. Tanguy, A. Wolf, Q. Wang, et al. // *Adv Biol Regul.* – 2022. – Vol. 83. – P. 100844. doi: 10.1016/j.jbior.2021.100844.
370. *PLD1* and *ERK2* regulate cytosolic lipid droplet formation / L. Andersson, P. Boström, J. Ericson, et al. // *J Cell Sci.* – 2006. – Vol. 119. – P. 2246-57. doi: 10.1242/jcs.02941.

371. Lee S. The genetic and epigenetic association of LDL Receptor Related Protein 1B (*LRP1B*) gene with childhood obesity / Lee S. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9(1). – P. 1815. doi: 10.1038/s41598-019-38538-2.
372. A novel family of mammalian transmembrane proteins involved in cholesterol transport / K.M. Méndez-Acevedo, V.J. Valdes, A. Asanov, et al. // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7(1). – P. 7450. doi: 10.1038/s41598-017-07077-z.
373. A Nutrigenetic Update on CETP Gene-Diet Interactions on Lipid-Related Outcomes / R. Wuni, G.G.C. Kuhnle, A.A. Wynn-Jones, et al. // *Curr Atheroscler Rep.* – 2022. – Vol. 24(2). – P. 119-132. doi: 10.1007/s11883-022-00987-y.
374. Living the PCSK9 Adventure: from the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia Towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs / M. Abifadel, S. Elbitar, P. El Khoury, et al. // *CurrAtheroscler Rep.* – 2014. – Vol. 16. – P. 439.
375. Marked plaque regression in homozygous familial hypercholesterolemia / L.F. Reeskamp, N.S. Nurmohamed, M.J. Bom, et al. // *Atherosclerosis.* – 2021. – Vol. 327. – P. 13-17. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.014.
376. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association / S.S. Gidding, M.A. Champagne, S.D. de Ferranti, et al. // *Circulation.* – 2015. – V. 22. – P. 2167-2192. doi: 10.1161/CIR.0000000000000297.
377. Carotid atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia patients: a pooled analysis of the ASAP, ENHANCE, RADIANCE 1, and CAPTIVATE studies / M. Vergeer, R. Zhou, M.L. Bots, et al. // *Circ Cardiovasc Imaging.* – 2010. – V. 4. – P. 398-404. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.109.909655.
378. Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis / E. de Groot, S.I. van Leuven, R. Duivenvoorden, et al. // *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* – 2008. – V. 5. – P. 280-288. doi: 10.1038/ncpcardio1163.
379. SAFEHEART risk-equation and cholesterol-year-score are powerful predictors of cardiovascular events in French patients with familial hypercholesterolemia / A. Gallo,

S. Charriere, A. Vimont, et al. // *Atherosclerosis*. – 2020. – V. 306. – P. 41-49. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.06.011.

380. Early coronary calcifications are related to cholesterol burden in heterozygous familial hypercholesterolemia / A. Gallo, P. Giral, A. Carrie, et al. // *J. Clin. Lipidol.* – 2017. V. 11. – P. 704–711.e2. doi: 10.1016/j.jacl.2017.03.016.

381. Greater preclinical atherosclerosis in treated monogenic familial hypercholesterolemia vs. polygenic hypercholesterolemia / M. Sharifi, E. Higginson, S. Bos, et al. // *Atherosclerosis*. – 2017. V. 263. – P. 405-411. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.015.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1.	Рисунок 2.1 – Дизайн исследования	С. 66
2.	Рисунок 2.2 – Нестабильная атеросклеротическая бляшка. Фиброатерома, истончения и надрывы покрышки. Окраска гематоксилин-эозин и Ван-Гизон, х 240	С. 77
3.	Рисунок 2.3 – Эрозия нестабильной атеросклеротической бляшки воспалительного типа. Окраска гематоксилин-эозин, х 240	С. 77
4.	Рисунок 2.4 – Нестабильная атеросклеротическая бляшка. Дистрофически-некротический тип. Кальциноз, дистрофия, очаги некроза, надрыв покрышки бляшки. Окраска гематоксилин-эозин и Ван Гизон, х 240	С. 78
5.	Рисунок 3.1 – Частота распространения вариантов в популяционных группах по данным 1000 Genome Project	С. 91
6.	Рисунок 3.2 – Частота распространения в популяционных группах редких аллелей rs5742904 и rs1042023 гена <i>APOB</i>	С. 92
7.	Рисунок 3.3 – Частота распространения в популяционных группах rs429358 и rs7412 гена <i>APOE</i>	С. 93
8.	Рисунок 3.4.1 – Изменения частиц липопротеинов низкой плотности под действием липопротеинлипазы	С. 113
9.	Рисунок 3.5.1 – Редкий вариант в регуляторном районе гена <i>LDLR</i>	С. 120
10.	Рисунок 3.5.2 – А. Семейная история и миссенс вариант rs879254721 NM_000527.5(<i>LDLR</i>):c.922G>A (p.Glu308Lys) гена <i>LDLR</i> в семье с наследственной гиперхолестеринемией. Б. Электрофореграмма последовательности с вариантом rs879254721 NM_000527.5(<i>LDLR</i>):c.922G>A (p.Glu308Lys) гена <i>LDLR</i> .	С. 122

11.	Рисунок 3.5.3 – Делеция экзонов <i>LDLR</i> 2–10 (а) и экзона 15 (b) у пациентов с СГХС	С. 124
12.	Таблица 1.1 – Наиболее распространенные наследственные нарушения липидного обмена, развивающиеся вследствие мутации в одном гене	С. 24
13.	Таблица 1.2 – Классификация гиперлипидемии, 1967 г. Фредриксон, Леви, Лис (ВОЗ)	С. 25
14.	Таблица 1.3 – Гены, определяющие фенотип семейной гиперхолестеринемии	С. 51
15.	Таблица 2.1 – Характеристика липидного спектра лиц с максимально высокими и низкими значениями ОХС из популяционной группы взрослого населения г. Новосибирска	С. 71
16.	Таблица 2.2 – Голландские диагностические критерии СГХС (Dutch Lipid Clinic Network Criteria)	С. 73
17.	Таблица 2.3 – Данные биохимического обследования пациентов старше 18 лет с СГХС	С. 74
18.	Таблица 2.4 – Описание бляшек для исследования РНК	С. 76
19.	Таблица 2.5 – Методы генотипирования полиморфизмов изученных генов	С. 81
20.	Таблица 2.6 – Праймеры для секвенирования промотора и экзонов гена <i>LDLR</i>	С. 82
21.	Таблица 3.1 – Частота аллелей однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии	С. 89
22.	Таблица 3.2 – Частота генотипов однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии	С. 95
23.	Таблица 3.2.1 – Спектр вариантов гена <i>LDLR</i> , n=20	С. 98

24.	Таблица 3.3.1 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов полиморфизма кодирующей части гена <i>APOE</i>	С. 102
25.	Таблица 3.3.2 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs708272 гена <i>CETP</i>	С. 105
26.	Таблица 3.3.3 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs320 гена <i>LPL</i>	С. 107
27.	Таблица 3.3.4 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs5888 гена <i>SCARB1</i>	С. 108
28.	Таблица 3.4.1 – Характеристика субфракционного профиля частиц липопротеинов низкой плотности ($M \pm m$, б)	С. 111
29.	Таблица 3.5.1 – Варианты в гене <i>LDLR</i> у пациентов с СГХС	С. 119
30.	Таблица 3.5.2 – Редкие варианты в генах <i>APOB</i> , <i>ABCG5</i> , <i>APOC3</i> , <i>LPL</i> , <i>SREBF1</i> у пациентов с семейной гиперхолестеринемией	С. 125
31.	Таблица 3.5.3 – Варианты в гене <i>PCSK9</i>	С. 127
32.	Таблица 3.5.4 – Редкие варианты, определенные у пациентов с фенотипом СГХС в генах липидного обмена при полногемном секвенировании	С. 131
33.	Таблица 3.6.1 – Спектр вариантов в гене <i>LDLR</i> у пациентов с коронарным атеросклерозом	С. 132
34.	Таблица 3.6.2 – Экспрессия генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках	С. 136
35.	Таблица 3.6.3 – Экспрессия генов аполипопротеинов С1 и Е в атеросклеротических бляшках и в тканях интактных коронарных сосудов	С. 138

Приложение А

Таблица А1 – Спектр вариантов в генах липидного обмена у пациентов с коронарным атеросклерозом

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr9	A	G	.	rs10820732	<i>ABCA1</i>	intronic	0.3589
chr9	G	A	.	rs10820733	<i>ABCA1</i>	intronic	0.3323
chr9	C	G	.	rs1331924	<i>ABCA1</i>	intronic	0.4002
chr9	G	T	.	rs2740485	<i>ABCA1</i>	intronic	1.0
chr9	A	G	.	rs4149336	<i>ABCA1</i>	intronic	0.6831
chr9	-	AA	.	rs377469216	<i>ABCA1</i>	splicing	0.5394 74
chr9	-	AAA	.	rs377469216	<i>ABCA1</i>	splicing	0.749
chr9	T	C	CM042912	rs2230808	<i>ABCA1</i>	exonic	0.8441
chr9	AG	-	.	rs373740929	<i>ABCA1</i>	intronic	0.8403
chr9	C	A	.	rs2777801	<i>ABCA1</i>	intronic	1.0
chr9	C	A	.	.	<i>ABCA1</i>	intronic	0.0
chr9	A	T	.	rs4743763	<i>ABCA1</i>	intronic	0.8427
chr9	T	-	.	rs55659052	<i>ABCA1</i>	intronic	0.0964
chr9	AGG	-	.	rs3029584	<i>ABCA1</i>	intronic	0.2595
chr9	-	C	.	rs4149346	<i>ABCA1</i>	intronic	0.8144
chr9	C	T	.	rs2246841	<i>ABCA1</i>	exonic	0.35
chr9	G	A	.	rs2274873	<i>ABCA1</i>	exonic	0.1228 07
chr9	A	G	.	rs2472444	<i>ABCA1</i>	intronic	0.7103

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr9	G	A	.	rs925724680	ABCA1	intronic	0.0009
chr9	C	T	CM030397	rs2230806	ABCA1	exonic	0.7103
chr9	A	C	.	rs2472434	ABCA1	intronic	0.7103
chr9	C	T	.	rs2230805	ABCA1	exonic	0.4887
chr9	AA	-	.	rs757015725	ABCA1	intronic	0.1366 91
chr9	A	-	.	.	ABCA1	intronic	0.0
chr9	C	G	.	.	ABCA1	intronic	0.0
chr9	C	T	.	rs12004282	ABCA1	intronic	0.163
chr9	A	G	.	rs10991386	ABCA1	intronic	0.8517
chr9	C	T	.	rs13291032	ABCA1	intronic	0.1862
chr9	A	G	.	rs4742925	ABCA1	intronic	0.5838
chr9	A	G	.	rs59237458	ABCA1	intronic	0.9342
chr9	C	T	.	rs2275542	ABCA1	intronic	0.4581
chr9	-	AAAC	.	rs112238361	ABCA1	intronic	0.2912
chr9	C	T	.	rs7027196	ABCA1	intronic	0.292
chr9	A	T	.	rs7043081	ABCA1	intronic	0.292
chr9	T	C	.	rs2275544	ABCA1	intronic	0.1891
chr9	A	G	.	rs2275545	ABCA1	intronic	0.3169
chr9	-	A	.	rs11370908	ABCA1	intronic	0.8724
chr9	G	A	.	rs77386036	ABCA1	intronic	0.3147
chr9	G	A	.	.	ABCA1	intronic	0.0
chr9	-	A	.	rs149556739	ABCA1	intronic	0.3994

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr9	-	G	.	rs35110205	<i>ABCA1</i>	intronic	0.6975
chr9	G	T	.	rs4742928	<i>ABCA1</i>	intronic	0.77
chr2	A	G	.	rs34198326	<i>ABCG8</i>	intronic	0,1345
chr2	G	A	.	rs11124949	<i>ABCG8</i>	intronic	0,0808
chr2	G	A	.	rs11124950	<i>ABCG8</i>	intronic	0,0828
chr2	A	G	.	rs76655836	<i>ABCG8</i>	intronic	0,0808
chr2	G	A	.	rs759152941	<i>ABCG8</i>	intronic	6,5E-06
chr2	T	G	.	rs55853083	<i>ABCG5</i>	UTR5	0,0706
chr2	G	A	.	rs9282575	<i>ABCG8</i>	exonic	0,15
chr2	C	T	.	rs9282572	<i>ABCG8</i>	intronic	0,0808
chr2	T	C	.	rs933862825	<i>ABCG5</i>	exonic	0,0001
chr11	A	G	.	rs5072	<i>APOA1</i> ; <i>APOA1-AS</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.9184 64
chr11	A	G	.	rs2070665	<i>APOA1</i> ; <i>APOA1-AS</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.9187 14
chr11	A	G	.	rs5070	<i>APOA1</i> ; <i>APOA1-AS</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.6745 07
chr11	GACA	-	.	rs35211609	<i>APOA4</i>	UTR3	0.5095
chr11	C	T	CM099363	rs5104	<i>APOA4</i>	exonic	0.8941

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr11	G	A	.	rs5100	<i>APOA4</i>	intronic	0.652
chr11	C	T	.	rs5092	<i>APOA4</i>	exonic	0.9
chr11	T	C	CS014761	rs2072560	<i>APOA5</i>	exonic; intronic	0.9947
chr11	C	T	CR080753	rs651821	<i>APOA5</i>	UTR5	0.9335 85
chr2	C	T	CM133911	rs1042034	<i>APOB</i>	exonic	0.8759
chr2	C	G	.	rs1801702	<i>APOB</i>	exonic	0.1462
chr2	C	T	CM068651	rs1042031	<i>APOB</i>	exonic	0.2127
chr2	A	G	.	rs12691188	<i>APOB</i>	intronic	0.1454
chr2	C	G	.	rs1800479	<i>APOB</i>	intronic	0.2177
chr2	C	T	.	rs148170480	<i>APOB</i>	exonic	0.0043
chr2	T	C	.	rs584542	<i>APOB</i>	exonic	1.0
chr2	T	C	.	rs568413	<i>APOB</i>	exonic	1.0
chr2	A	G	.	rs488329	<i>APOB</i>	intronic	1.0
chr2	A	T	.	rs3749054	<i>APOB</i>	intronic	0.2127
chr2	T	C	.	rs497166	<i>APOB</i>	intronic	0.9867
chr2	T	C	.	rs12720820	<i>APOB</i>	intronic	0.2724
chr2	A	G	.	rs12713956	<i>APOB</i>	intronic	0.2759
chr2	C	T	.	rs12720838	<i>APOB</i>	UTR3; intronic	0.2023
chr2	G	A	CM984191	rs679899	<i>APOB</i>	exonic	0.8641
chr2	T	G	.	rs570877	<i>APOB</i>	intronic	0.9623

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr2	-	CATC T	.	rs10701091	<i>APOB</i>	intronic	0.9623
chr2	G	A	.	rs550619	<i>APOB</i>	intronic	0.9613
chr2	T	G	.	rs531819	<i>APOB</i>	intronic	0.9981
chr2	C	A	.	rs661665	<i>APOB</i>	intronic	0.879
chr2	C	T	CM133911	rs1042034	<i>APOB</i>	exonic	0.8759
chr2	C	G	.	rs1801702	<i>APOB</i>	exonic	0.1462
chr2	C	T	CM068651	rs1042031	<i>APOB</i>	exonic	0.2127
chr2	A	G	.	rs12691188	<i>APOB</i>	intronic	0.1454
chr2	C	G	.	rs1800479	<i>APOB</i>	intronic	0.2177
chr2	C	T	.	rs148170480	<i>APOB</i>	exonic	0.0043
chr2	T	C	.	rs584542	<i>APOB</i>	exonic	1.0
chr2	T	C	.	rs568413	<i>APOB</i>	exonic	1.0
chr2	A	G	.	rs488329	<i>APOB</i>	intronic	1.0
chr2	A	T	.	rs3749054	<i>APOB</i>	intronic	0.2127
chr2	T	C	.	rs497166	<i>APOB</i>	intronic	0.9867
chr2	T	C	.	rs12720820	<i>APOB</i>	intronic	0.2724
chr2	A	G	.	rs12713956	<i>APOB</i>	intronic	0.2759
chr2	C	T	.	rs12720838	<i>APOB</i>	UTR3; intronic	0.2023
chr2	G	A	CM984191	rs679899	<i>APOB</i>	exonic	0.8641
chr2	T	G	.	rs570877	<i>APOB</i>	intronic	0.9623

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr2	-	CATC T	.	rs10701091	<i>APOB</i>	intronic	0.9623
chr2	G	A	.	rs550619	<i>APOB</i>	intronic	0.9613
chr2	T	G	.	rs531819	<i>APOB</i>	intronic	0.9981
chr2	C	A	.	rs661665	<i>APOB</i>	intronic	0.879
chr19	T	A	.	rs5120	<i>APOC2</i> ; <i>APOC4</i> - <i>APOC2</i>	UTR5; ncRNA_ exonic; ncRNA_ intronic	0.8033
chr19	T	G	.	rs10422603	<i>APOC2</i> ; <i>APOC4</i> - <i>APOC2</i>	UTR5; ncRNA_ exonic; ncRNA_ intronic	0.3088
chr19	T	C	.	rs4803776	<i>APOC2</i> ; <i>APOC4</i> - <i>APOC2</i>	UTR3;nc RNA_ex onic;ncR NA_intr onic	0.8018
chr11	T	C	CM942309	rs4520	<i>APOC3</i>	exonic	0.85
chr11	T	C	.	rs645901	<i>APOC3</i>	intronic	0.8427

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr11	G	C	CR041556	rs5128	<i>APOC3</i>	UTR3	0.9071 28
chr11	G	T	.	rs4225	<i>APOC3</i>	UTR3	0.6255 13
chr19	G	T	.	.	<i>APOC4- APOC2</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.0
chr19	A	G	.	rs4803774	<i>APOC4- APOC2</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.6474
chr19	T	C	.	rs4803775	<i>APOC4- APOC2</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.8033
chr3	A	G	.	rs1568566	<i>APOD</i>	intronic	0.9968
chr19	C	G	CR033687	rs440446	<i>APOE</i>	exonic; intronic	0.8812
chr19	C	T	CM860003	rs7412	<i>APOE</i>	exonic	0.1061
chr16	A	G	.	.	<i>CETP</i>	intronic	0.0
chr16	G	T	.	rs891141	<i>CETP</i>	intronic	1.0
chr16	T	C	.	rs891142	<i>CETP</i>	intronic	1.0
chr16	T	C	.	rs891143	<i>CETP</i>	intronic	1.0
chr16	T	G	.	rs11076176	<i>CETP</i>	intronic	0.4554
chr16	G	A	.	rs289714	<i>CETP</i>	intronic	0.8576

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr16	A	G	.	rs12447620	<i>CETP</i>	intronic	0.8784
chr16	CTGCCA GGAAGA	-	.	rs11276066	<i>CETP</i>	intronic	0.8738
chr16	G	A	.	rs7195984	<i>CETP</i>	intronic	1.0
chr16	C	T	.	rs1800774	<i>CETP</i>	intronic	0.3737
chr16	G	A	CM994290	rs5882	<i>CETP</i>	exonic	0.6878
chr16	G	A	.	rs289741	<i>CETP</i>	intronic	0.7075
chr19	G	A	.	rs745409684	<i>LDLR</i>	intronic	3.84e-05
chr19	-	TTTTT A	.	.	<i>LDLR</i>	intronic	0.0
chr19	G	A	.	.	<i>LDLR</i>	intronic	0.0003
chr19	C	T	.	.	<i>LDLR</i>	intronic	0.0
chr19	A	G	.	rs774600508	<i>LDLR</i>	exonic	2.59e-05
chr19	A	C	.	rs12983082	<i>LDLR</i>	intronic	0.4977
chr19	G	A	.	rs10422256	<i>LDLR</i>	intronic	0.5336
chr19	A	G	.	rs892116	<i>LDLR</i>	intronic	0.7587
chr19	T	C	.	rs2738442	<i>LDLR</i>	intronic	1.0
chr19	G	C	CS022877; CS040544	rs12710260	<i>LDLR</i>	intronic	0.4879
chr19	A	G	.	rs5930	<i>LDLR</i>	exonic	0.7504
chr19	A	G	.	rs1569372	<i>LDLR</i>	intronic	0.5035

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr19	G	T	.	rs9789328	LDLR	intronic	0.4777
chr19	AA	-	.	rs533803213	LDLR	intronic	0.7968
chr19	C	T	.	rs2738445	LDLR	intronic	0.6772
chr19	C	G	.	rs2738446	LDLR	intronic	0.4761
chr19	A	C	.	rs2738447	LDLR	intronic	0.7958
chr19	C	T	CM984053	rs688	LDLR	exonic	0.55
chr19	C	T	.	rs9789302	LDLR	intronic	0.4807
chr19	-	CA	.	rs35653724	LDLR	intronic	0.5418
chr19	T	C	.	rs2569549	LDLR	intronic	0.5418
chr19	AAAC	-	.	rs140888317	LDLR	intronic	0.8107
chr19	T	C	CM080431	rs5925	LDLR	exonic	0.55
chr19	A	G	.	rs2569546	LDLR	intronic	0.8101
chr19	A	G	.	rs5927	LDLR	exonic	0.9554
chr19	A	C	.	rs780341886	LDLR	intronic	3.84e-05
chr19	G	C	.	.	LDLR	intronic	0.0
chr19	C	T	.	rs966316578	LDLR	intronic	0.0
chr19	T	C	.	.	LDLR	intronic	0.0
chr19	A	G	.	rs12459476	LDLR	intronic	0.4839
chr19	A	G	.	rs2569538	LDLR	intronic	0.9256
chr19	T	C	.	rs68141833	LDLR	intronic	0.4835
chr19	A	G	.	rs6413504	LDLR	intronic	0.5161
chr19	G	C	.	rs2738464	LDLR	UTR3	0.8921

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr19	T	C	.	rs1433099	<i>LDLR</i>	UTR3	0.7983
chr19	-	A	.	rs34113544	<i>LDLR</i>	UTR3	0.7147
chr19	C	G	.	rs3180023	<i>LDLR</i>	UTR3	0.7147
chr19	C	T	.	rs2738467	<i>LDLR</i>	UTR3	0.4835
chr19	TA	-	.	rs397844005	<i>LDLR</i>	UTR3	0.9308
chr19	C	T	.	rs1003723	<i>LDLR</i> ; <i>MIR6886</i>	intronic; ncRNA_ exonic	0.4928
chr1	G	-	CM014011	.	<i>LDLRAP1</i>	exonic	0.0
chr1	A	-	.	rs34367689	<i>LDLRAP1</i>	intronic	0.5479
chr1	C	T	.	rs12096438	<i>LDLRAP1</i>	UTR5; intronic	0.5828
chr1	T	C	.	rs6687605	<i>LDLRAP1</i>	exonic	0.5828
chr1	G	A	.	rs6688931	<i>LDLRAP1</i>	intronic	0.569
chr1	A	G	.	rs6661159	<i>LDLRAP1</i>	intronic	0.5828
chr1	A	G	.	rs28969504	<i>LDLRAP1</i>	exonic	0.829
chr12	-	T	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0148
chr12	TTTTTTT T	-	.	rs750592109	<i>LIMA1</i>	intronic; ncRNA_ exonic	0.0177
chr12	T	C	.	rs2302900	<i>LIMA1</i>	intronic	0.4734
chr12	C	A	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0
chr12	C	T	.	rs137920360	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0941

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr12	A	G	.	rs960151405	<i>LIMA1</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.0
chr12	T	C	.	rs2358539	<i>LIMA1</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.5348
chr12	G	A	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.0
chr12	C	A	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic; n cRNA_i ntronic	0.0
chr12	C	T	.	rs6580730	<i>LIMA1</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.5297
chr12	C	T	.	rs71465002	<i>LIMA1</i>	intronic	0.5153
chr12	CT	-	.	rs35576436	<i>LIMA1</i>	intronic	0.5164
chr12	T	C	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0
chr12	T	G	.	rs6580732	<i>LIMA1</i>	intronic	0.9281
chr12	T	C	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0
chr12	-	A	.	rs35730958	<i>LIMA1</i>	intronic	0.8956
chr12	C	T	.	rs77721955	<i>LIMA1</i>	intronic	0.471

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr12	T	C	.	rs74416335	<i>LIMA1</i>	intronic	0.4673
chr12	G	T	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0
chr12	A	G	.	.	<i>LIMA1</i>	intronic	0.0
chr12	C	A	.	rs11169351	<i>LIMA1</i>	intronic	0.5378
chr10	C	G	.	rs2071509	<i>LIPA</i>	intronic	0.5655
chr10	T	C	.	rs11203042	<i>LIPA</i>	intronic	0.6717
chr10	G	A	.	rs11203043	<i>LIPA</i>	intronic	0.4539
chr10	G	A	.	rs1041388	<i>LIPA</i>	intronic	0.4546
chr10	C	A	.	rs2250781	<i>LIPA</i>	UTR5; intronic	0.7802
chr10	TTTATTT A	-	.	rs200372012	<i>LIPA</i>	intronic	0.5777 2
chr10	-	T	.	rs373931086	<i>LIPA</i>	intronic	0.2769
chr10	T	C	.	rs4934462	<i>LIPA</i>	intronic	0.9671
chr10	-	A	.	rs200777645	<i>LIPA</i>	intronic	0.2444
chr10	A	G	.	rs304496	<i>LIPA</i>	intronic	1.0
chr10	C	A	.	.	<i>LIPA</i>	intronic	0.0
chr15	CA	-	.	rs10560478	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	A	T	.	rs34727257	<i>LIPC</i>	intronic	0.3461
chr15	T	-	.	rs34803784	<i>LIPC</i>	intronic	0.5825
chr15	C	A	.	rs495806	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	C	T	CS035716	rs8192701	<i>LIPC</i>	intronic	0.174
chr15	A	C	.	rs7177852	<i>LIPC</i>	intronic	1.0

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr15	T	C	.	rs2414592	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	C	G	.	rs6084	<i>LIPC</i>	exonic	0.75
chr15	A	C	.	rs1007543	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	C	A	CM962679	rs3829462	<i>LIPC</i>	exonic	1.0
chr15	A	G	.	rs3829461	<i>LIPC</i>	exonic	1.0
chr15	AC	-	.	rs59377652	<i>LIPC</i>	intronic	0.9966
chr15	C	T	.	rs55913623	<i>LIPC</i>	intronic	0.9966
chr15	G	A	.	rs67897154	<i>LIPC</i>	intronic	0.6319
chr15	G	A	.	rs4288939	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	T	G	.	rs7163112	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	G	C	.	rs4775080	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	A	G	.	rs4775081	<i>LIPC</i>	intronic	1.0
chr15	A	G	.	rs17269397	<i>LIPC</i>	exonic; intronic	0.631
chr15	A	T	.	rs3829460	<i>LIPC</i>	UTR3; intronic	0.7444
chr18	T	G	CR1110872	rs34474737	<i>LIPG</i>	UTR5	0.3535
chr18	C	T	.	rs35978968	<i>LIPG</i>	intronic	0.3463
chr18	C	G	.	rs35816125	<i>LIPG</i>	intronic	0.3385
chr18	C	T	.	rs2000812	<i>LIPG</i>	intronic	0.9902
chr18	C	T	CM077882	rs2000813	<i>LIPG</i>	exonic	0.45
chr18	A	G	.	rs10083905	<i>LIPG</i>	intronic	0.9894

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr18	G	A	.	rs1320700	<i>LIPG</i>	intronic	0.309789
chr18	T	C	.	rs2276269	<i>LIPG</i>	intronic	0.8593
chr18	C	T	.	rs6507931	<i>LIPG</i>	intronic	0.6605
chr6	C	G	.	rs73012273	<i>LPA</i>	UTR3	0.022
chr6	G	A	.	rs3124784	<i>LPA</i>	exonic	0.3072
chr6	A	G	.	rs3127596	<i>LPA</i>	intronic	0.3533
chr6	G	C	.	rs9365169	<i>LPA</i>	intronic	0.5292
chr6	-	T	.	rs199575321	<i>LPA</i>	intronic	0.3214
chr6	C	T	.	rs9457935	<i>LPA</i>	intronic	0.7269
chr6	C	T	.	rs41264844	<i>LPA</i>	intronic	0.0377
chr6	C	T	.	rs4708871	<i>LPA</i>	intronic	1.0
chr6	A	G	.	rs1801693	<i>LPA</i>	exonic	0.8873
chr6	C	G	.	rs10755578	<i>LPA</i>	intronic	0.492
chr6	G	A	.	rs7761293	<i>LPA</i>	intronic	0.8071
chr6	A	G	.	rs9457938	<i>LPA</i>	intronic	1.0
chr6	C	T	.	rs9355291	<i>LPA</i>	intronic	0.5168
chr6	TT	-	.	rs34747443	<i>LPA</i>	intronic	0.4739
chr6	T	C	.	rs6455694	<i>LPA</i>	intronic	1.0
chr6	T	A	.	rs1569933	<i>LPA</i>	intronic	0.7334
chr6	T	A	.	rs2315129	<i>LPA</i>	intronic	0.562
chr6	C	T	CR066329	rs1800769	<i>LPA</i>	UTR5	0.4774
chr6	A	G	CR952231	rs1853021	<i>LPA</i>	UTR5;	0.9683

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
						intronic; upstream	
chr8	C	T	.	rs10104051	<i>LPL</i>	intronic	0.8964
chr8	T	A	.	rs56321069	<i>LPL</i>	intronic	0.708
chr8	T	A	.	rs13252357	<i>LPL</i>	intronic	1.0
chr8	G	A	.	rs248	<i>LPL</i>	exonic	0.0865
chr8	T	C	.	rs301	<i>LPL</i>	intronic	0.4911
chr8	C	A	.	rs316	<i>LPL</i>	exonic	0.2379
chr8	A	G	.	rs326	<i>LPL</i>	intronic	0.5862
chr8	T	G	CS099092	rs327	<i>LPL</i>	intronic	0.4379
chr8	C	T	.	rs190762958	<i>LPL</i>	intronic	0.0101
chr8	G	A	.	rs4922115	<i>LPL</i>	UTR3	0.2552
chr6	-	TC	.	rs146166975	<i>LTA</i>	intronic	0.3605
chr11	A	G	.	rs476185	<i>MMP12</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.8502
chr11	A	T	.	rs28381684	<i>MMP12</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.1892
chr11	T	C	.	rs17368582	<i>MMP12</i>	exonic; ncRNA_ exonic	0.1816
chr11	-	T	.	rs5794199	<i>MMP12</i>	exonic;	1.0

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
						ncRNA_ exonic; splicing	
chr11	G	T	.	rs5003690	<i>MMP12</i>	exonic; ncRNA_ exonic	1.0
chr11	TTTG	-	.	rs782573197	<i>MMP12</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.0353 62
chr11	G	T	.	rs17368659	<i>MMP12</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.1933
chr11	CAAA	-	.	rs28360358	<i>MMP12</i>	intronic; ncRNA_ intronic	0.416
chr20	C	T	.	rs3918253	<i>MMP9</i>	intronic	0.5819 86
chr20	G	A	.	rs3918256	<i>MMP9</i>	intronic	0.5821 36
chr20	G	C	CM064121	rs2250889	<i>MMP9</i>	exonic	1.0
chr20	A	C	.	rs13969	<i>MMP9</i>	exonic	0.7222 22

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr20	C	T	.	rs20544	<i>MMP9</i> ; <i>SLC12A5-AS1</i>	UTR3; ncRNA_ intronic	0.5822 19
chr1	A	G	.	rs2495482	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9816
chr1	-	T	.	rs201708428	<i>PCSK9</i>	intronic	0.0527
chr1	C	T	.	rs11206513	<i>PCSK9</i>	intronic	0.8393
chr1	C	T	.	rs6681159	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9425
chr1	-	C	.	rs11436234	<i>PCSK9</i>	intronic	0.8373
chr1	G	T	.	rs534473	<i>PCSK9</i>	intronic	0.8731
chr1	C	A	.	rs11206514	<i>PCSK9</i>	intronic	0.8363
chr1	C	G	.	rs613855	<i>PCSK9</i>	intronic	0.7956
chr1	C	G	.	rs624612	<i>PCSK9</i>	intronic	0.751
chr1	C	-	.	rs397735050	<i>PCSK9</i>	intronic	0.7643
chr1	C	T	.	rs2483205	<i>PCSK9</i>	intronic	0.5053
chr1	A	G	.	rs2495477	<i>PCSK9</i>	intronic	0.7526
chr1	C	A	.	rs494198	<i>PCSK9</i>	intronic	0.8026
chr1	A	G	.	rs509504	<i>PCSK9</i>	exonic	1.0
chr1	C	T	.	rs584626	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9987
chr1	C	T	.	rs585131	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9987
chr1	A	G	.	rs540796	<i>PCSK9</i>	exonic	0.9987
chr1	G	A	CM045990	rs562556	<i>PCSK9</i>	exonic	0.9987
chr1	GTGTGTG TGTGTGT	-	.	rs368103912	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9931

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr1	T	C	.	rs563641	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9974
chr1	G	A	.	rs483462	<i>PCSK9</i>	intronic	0.873
chr1	T	G	.	rs602705	<i>PCSK9</i>	intronic	0.9962
chr1	G	A	CM051950	rs505151	<i>PCSK9</i>	exonic	0.9810 61
chr17	A	G	.	rs12941356	<i>SREBF1</i>	UTR3; intronic	0.5655
chr17	A	G	.	rs4925115	<i>SREBF1</i>	intronic	0.754
chr17	-	C	.	rs35763683	<i>SREBF1</i>	intronic	0.6604
chr17	T	C	.	rs1108511	<i>SREBF1</i>	intronic	1.0
chr17	A	G	.	rs12953299	<i>SREBF1</i>	intronic	0.5399
chr17	C	T	.	rs12936927	<i>SREBF1</i>	intronic	0.6089
chr17	C	T	.	rs9894257	<i>SREBF1</i>	intronic	0.6692
chr17	T	C	.	rs7503747	<i>SREBF1</i>	intronic	0.6133
chr17	T	C	.	rs4924821	<i>SREBF1</i>	intronic	0.5822
chr17	C	-	CD015329	rs60282872	<i>SREBF1</i>	UTR5	0.6103
chr17	C	G	.	rs2297508	<i>SREBF1</i> ; <i>SREBP-1</i>	UTR3; exonic; ncRNA_ exonic	0.6201
chr4	A	C	.	rs1962700	<i>STAP1</i>	intronic	0.8658
chr4	G	T	.	rs183789729	<i>STAP1</i>	intronic	0.0081
chr4	G	C	.	rs2046600	<i>STAP1</i>	intronic	0.9034

Продолжение таблицы А1

Хромосома	Референс	Последовательность	База HGMD	Идентификационный номер	Название гена	Локализация	Максимальная частота в популяции по базе данных GnomAD
chr4	C	A	.	.	<i>STAP1</i>	intronic	0.0
chr4	G	A	.	rs13103601	<i>STAP1</i>	intronic	0.5878 2
chr4	T	A	.	rs9986059	<i>STAP1</i>	intronic	0.9040 61
chr4	T	C	.	rs13111555	<i>STAP1</i>	intronic	0.9040 11
chr4	T	C	.	rs2306810	<i>STAP1</i>	intronic	0.2873
chr4	A	G	.	rs11556614	<i>STAP1</i>	exonic	0.6264 13
chr4	C	T	.	rs13124445	<i>STAP1</i>	intronic	0.3956
chr4	T	C	.	rs28479463	<i>STAP1</i>	intronic	0.4658
chr4	A	G	.	rs2242331	<i>STAP1</i>	intronic	0.3414
chr4	C	T	.	rs4351067	<i>STAP1</i>	intronic	0.5804 52
chr4	G	A	.	rs35798615	<i>STAP1</i>	intronic	0.3865
chr4	A	G	.	rs2627246	<i>STAP1</i>	intronic	0.9923

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность учителю и научному руководителю доктору медицинских наук, профессору, академику РАН Воеводе Михаилу Ивановичу за помощь в исследованиях, обсуждении сложных концепций и идей на протяжении всего процесса подготовки диссертации.

Автор признателен доктору медицинских наук, профессору, член-корреспонденту РАН Рагино Юлии Игоревне за поддержку в процессе написания диссертации.

Личную благодарность я хочу выразить научному сотруднику лаборатории молекулярной генетики человека ИЦиГ СО РАН Иванощук Динаре Евгеньевне за всестороннюю поддержку в жизни, работе и помощь в проведении экспериментальной части исследования.

Автор признателен сотрудникам лаборатории молекулярной генетики человека ИЦиГ СО РАН к.б.н. Михайловой Светлане Владимировне, Орлову Павлу Сергеевичу, Семаеву Сергею Евгеньевичу, Кунгурцевой Ольге Николаевне, сотрудникам лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ – филиал ИЦиГ СО РАН д.м.н., профессору Максиму Владимиру Николаевичу, Пономаревой Ирине Витальевне, сотрудникам сектора геномных механизмов онтогенеза ИЦиГ СО РАН к.м.н. Фишману Вениамину Семеновичу и Валеевой Эмиль Салаватовне, сотрудникам лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований терапевтических заболеваний НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН д.б.н. Каштановой Елене Владимировне, д.б.н. Полонской Яне Владимировне за многолетнее сотрудничество в различных сферах научных исследований.

Отдельные слова признательности я хотела бы сказать коллегам из НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН, принимавшим участие в обследовании пациентов, включенных в исследование, д.м.н., профессору Малютиной Софье Константиновне, д.м.н., профессору Гафарову Валерию Васильевичу, к.м.н., заслуженному врачу РФ Латынцевой Людмиле Дмитриевне, к.м.н. Тимощенко

Ольге Владимировне, сотрудникам Национального медицинского исследовательского центра им. акад. Е.Н. Мешалкина д.м.н., член-корреспонденту РАН Чернявскому Александру Михайловичу, д.м.н. Волкову Александру Михайловичу, к.м.н. Мурашову Ивану Сергеевичу.

Автор благодарна за причастность к научной школе д.м.н., профессора, академика РАН Никитина Юрия Петровича.

Автор хотела бы почтить память коллег, с которыми начинался первый этап исследований диссертации, к.м.н. Долгих Михаила Михайловича и к.м.н. Куликова Игоря Вячеславовича.

Автор особенно признательна своим Родителям и всей своей Семье за поддержку, терпение и заботу.