

На правах рукописи



ШАХТШНЕЙДЕР ЕЛЕНА ВЛАДИМИРОВНА

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

1.5.7 Генетика

3.1.20 Кардиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Новосибирск – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины – филиале Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

Воевода Михаил Иванович

Официальные оппоненты:

Викторова Татьяна Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра биологии, заведующая кафедрой (г. Уфа)

Каретникова Виктория Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии, профессор кафедры (г. Кемерово)

Полоников Алексей Валерьевич, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научно-исследовательский институт генетической и молекулярной эпидемиологии, директор (г. Курск)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «__» _____ 20__ г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.215.03 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» по адресу: г. Томск, Московский тр., 3, Научно-исследовательский институт медицинской генетики Томского НИМЦ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», адрес сайта <http://tnimc.ru/>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Назаренко Мария Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно более 70% всех случаев смерти в мире составляют случаи смерти от неинфекционных болезней (WHO, 2023). Максимальная доля в структуре смертности от неинфекционных болезней представлена сердечно-сосудистой патологией (Tsao C.W. et al., 2023), среди которой наиболее распространены атеросклеротические сердечно-сосудистые заболевания; 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 (Roth G.A. et al., 2020). Распространение сердечно-сосудистой патологии атеросклеротического генеза в значительной степени обусловлено основными модифицируемыми факторами риска: высоким индексом массы тела (ИМТ), высоким артериальным давлением, гиперхолестеринемией и неправильным питанием (Vaduganathan M. et al., 2022; Bauersachs R. et al., 2019). Современные молекулярно-генетические и биохимические технологии играют ключевую роль в решении фундаментальных проблем атерогенеза (Ежов М.В. и др., 2023; Кухарчук В.В. и др., 2020; Iqbal J. et al., 2018).

Эффективным способом ранней диагностики и профилактики атеросклеротических изменений является выявление генетических маркеров предрасположенности к данной патологии и изучение их особенностей в различных популяциях (Meshkov A. et al., 2021). Необходимо изучение каждой популяции, как по характеру вариабельности генов предрасположенности к патологиям, 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.

В настоящее время известны гены, определенные варианты которых ассоциированы с нарушениями липидного обмена (Quaye L.N.K. et al., 2023; Abifadel M. et al., 2023). В их число входят гены, кодирующие липопротеины и их рецепторы, внутриклеточные и внеклеточные липидпереносящие белки, ферменты. 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 (Liu D.J. et al., 2017).

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

Степень разработанности темы исследования

Анализ литературы свидетельствует, что в мире активно ведется изучение генетики моногенных и многофакторных заболеваний с использованием различных технологий, включая полноэкзомные исследования на десятках и сотнях тысяч образцов (Liu D.J. et al., 2017), что позволило определить генетическую основу моногенных дислипидемий. При молекулярно-генетическом исследовании могут быть выявлены редкие и распространенные варианты изменения структуры ДНК, лежащие в основе дислипидемии (van der Laan S.W. et al., 2018).

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 (Brown E.E. et al., 2020). В 40-50% случаев причины фенотипически выраженной семейной гиперхолестеринемии остаются неизвестны (Mgliara G. et al., 2017).

В России изучение молекулярно-генетических особенностей семейной гиперхолестеринемии проводится в разных регионах страны на протяжении нескольких десятилетий (Мешков А.Н. и др., 2021; Кухарчук В.В. и др., 2020; Васильев В.Б. и др., 2020; Ершова А.И. и др., 2019). 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 (Васильев В.Б. и др., 2020).

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 перцентилья) 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 показали, что 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 три 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 улучшить 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., Шахтшнейдер Е.В., Покровский С.Н., и др. / Атеросклероз и дислипидемии. 2019. №1 (34). С. 5-43).

Методология и методы диссертационного исследования

Выборка из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия) сформирована на базе одномоментного эпидемиологического обследования взрослого населения в двух административных районах г. Новосибирска. 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. Исследование имеет ограничение в связи с тем, что популяционный фрагмент изучался для возраста 45-69 лет. 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. 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 ($n=30$). 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 вариантов.

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 международными рекомендациями. Номенклатура выявленных вариантов приведена согласно рекомендациям Sequence Variant Nomenclature (<http://varnomen.hgvs.org>, 2021).

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 процентиля) 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 процентиля), 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 и апробация результатов

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. 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 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. Согласно современным нормативам статистического анализа, объём 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.

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

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 – филиала ИЦиГ СО РАН 23 апреля 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

Основное содержание диссертационной работы и ее результаты отражены в 63 научных работах. По теме диссертации опубликовано 20 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных Перечнем ВАК Российской Федерации, и 6 статей в зарубежных рецензируемых журналах, четыре 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 диссертационной работе представлены результаты, полученные автором лично или под его непосредственным руководством. Автором проведен обзор литературы по теме диссертации, 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 НАПЕЕ). 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 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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.

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).

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, а также полногеномное секвенирование ДНК; в группе

пациентов с коронарным атеросклерозом выполнено полноэкзомное секвенирование образцов ДНК и полногеномное секвенирование образцов РНК с анализом генов липидного обмена.

Репрезентативная выборка из популяции взрослого населения г. Новосибирска (Западная Сибирь, Россия) 45-69 лет – 9600 человек – сформирована на базе одномоментного эпидемиологического обследования взрослого населения в двух административных районах г. Новосибирска. 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. Новосибирске, Россия – академик РАН, профессор, д.м.н. Никитин Ю.П. и профессор, д.м.н. Малютина С.К.). Для молекулярно-генетического исследования нарушений липидного обмена из основной выборки были отобраны методом случайных чисел 936 человек, что составило 10% обследованных лиц. 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.

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 клинко-функциональным критериям (по данным расшифровки ЭКГ по Минессотскому коду) и другие обследования. Забор крови для исследования проводился натошак из локтевой вены. Уровни липидных показателей (ОХС, ТГ, ХС-ЛНП, ХС-ЛВП) определяли энзиматическими методами с использованием стандартных наборов «Bioscop» (Германия) на биохимическом анализаторе "Labsystem 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. Индекс атерогенности (ИА) рассчитан 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.

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). На следующем шаге 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).

Группа пациентов с семейной гиперхолестеринемией (СГХС) формировалась в клиничко-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 [ВОЗ, 1999]. 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 (Leren T.P. et al., 2004). 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 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 $8,6 \pm 3,4$ ммоль/л, максимальный уровень 25 ммоль/л. Относительно невысокий уровень ОХС обусловлен тем, что на момент первичного осмотра врачом-липидологом клиничко-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.

Образцы атеросклеротических бляшек и венозной крови были получены от пациентов ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства Здравоохранения

РФ (руководитель интеграционного проекта – д.м.н., проф. Чернявский А.М.). 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. У обследованных лиц 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 – $30,5 \pm 2,2$ кг/м². Курили 45%. Все пациенты получали липид-снижающую терапию препаратами группы статинов.

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.). 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.

Выполнен анализ промежуточных фракций липопротеинов низкой плотности для 180 человек в популяционной группе населения г. Новосибирска (группа с гиперхолестеринемией более 8,0 ммоль/л ОХС, n=60; группа со значениями общего холестерина сыворотки менее 5,2 ммоль/л ОХС, n=60; выборка из популяционной группы, n=60). Группы были сформированы из основной выборки (n=909) методом случайных чисел. Исследование проведено 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 с последующей окраской геля Coomassie blue R.

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

Выделение РНК. Фрагменты ткани атеросклеротических бляшек, предназначенные для генетического исследования, незамедлительно помещались в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN, Германия) и замораживались. Выделение РНК из образцов проводили при помощи набора РеалБест экстракция 100 (АО Вектор Бест, Новосибирск, Россия).

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* с использованием ПЦР-ПДРФ и РТ-ПЦР.

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

Таргетное высокопроизводительное секвенирование. 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*. Таргетное секвенирование проведено с использованием NimbleGen SeqCap Target Enrichment (Roche) на секвенаторе MiSeq (Illumina, USA). Покрытие составило 97%. Анализ данных секвенирования включает картирование данных на геном человека версии GRCh38. Для верификации мутаций, выявленных методом высокотехнологичного секвенирования, использовалось прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру.

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).

Полногеномное секвенирование ДНК в группе пациентов с семейной гиперхолестеринемией. На основании выборки семейной гиперхолестеринемии, сформированной по критериям DLCN и включающей случаи заболевания, подтвержденные молекулярно-генетическим анализом, с использованием программы на языке Python 3.9 построены ансамбли решающие деревья, которые позволили выделить

из выборки случаи, требующие дополнительного молекулярно-генетического анализа. Пять пробандов с наиболее тяжелым фенотипом СГХС без патогенных вариантов в изученных генах для выполнения полногеномного секвенирования на платформе HiSeq 1500 (Illumina). Автоматизированную обработку и аннотирование полученных данных секвенирования проводили на платформе NGS Wizard (genomenal.ru). Потенциальный эффект влияния новых миссенс-вариантов на функцию/структуру белка оценивали с помощью данных инструментов прогнозирования: CADD (<https://cadd.gs.washington.edu/snv>), PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) и MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>), а также данных о частоте этих вариантов в популяциях, согласно gnomAD. Патогенность новых вариантов оценивали в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии (ACMG) (Richards et al., 2015). Анализ сетей белок-белковых взаимодействий выполняли в STRING (Szklarczyk et al., 2019).

Полноэкзомное секвенирование ДНК в группе пациентов с коронарным атеросклерозом. 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) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Покрывание 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 (<https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP>), объединяя данные из инструментов прогнозирования *in silico*: SIFT (<http://sift.jcvi.org/>), Polyphen2 v2.2.5 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/dokuwiki/about>), MutationTaster2 (<http://www.mutationtaster.org/>), PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>) и другие.

Интерпретация данных, полученных методом секвенирования, проведена в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики (Richards S., 2015). Проведен анализ данных выявленных вариантов в исследуемых генах с использованием ресурсов Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), LOVD (<https://databases.lovd.nl/shared/genes>); оценка частоты встречаемости в базах данных – 1000genomes (<http://www.internationalgenome.org/>) и gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>).

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 повторях: стабильной атеросклеротической бляшки фиброзного типа и нестабильной атеросклеротической бляшки дистрофически-некротического типа.

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, 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.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили в пакете прикладных статистических программ SPSS Software (Version 22.0, SPSS inc., Chicago, Illinois). 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^2 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 $p \leq 0,01$.

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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ распространенности аллелей однонуклеотидных вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2*

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

Таблица 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 (894) 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

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

Проведен анализ полиморфизма кодирующей части гена *APOE* в позиции 3937C/T и 4075C/T – наиболее распространенным является аллель $\epsilon 3$. Результаты коррелируют с данными о распространенности аллеля $\epsilon 3$ в мире (Karjalainen J.P. et al., 2019; Lumsden A.L. et al., 2020). Частота аллелей $\epsilon 2$ и $\epsilon 4$ сопоставима с частотой распространения в европеоидных популяциях Восточной и Западной Европы (Wolters F.J. et al., 2019; Adler G. et al., 2017).

Выполнен анализ распространенности генотипов вариантов генов *ABCA1*, *APOA1*, *APOB*, *APOC3*, *APOE*, *CETP*, *CLPS*, *LPL*, *SCARB1* и *SREBF2* (таблица 2).

Таблица 2 – Частота генотипов однонуклеотидных вариантов генов, ассоциированных с развитием гиперхолестеринемии

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

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 (Воевода М.И. и др., 2016).

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.

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

Впервые полное секвенирование кодирующей части гена *LDLR* выполнено не только для больных с клиническими формами СГХС, но и для выборки случаев выраженной гиперхолестеринемии в популяционной группе г. Новосибирска (Западная Сибирь). 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). В нашем исследовании мы не обнаружили редких вариантов в промоторе, первом и восемнадцатом экзонах гена *LDLR* у лиц с гиперхолестеринемией. Выявлены ранее не описанные варианты в экзоне 9 p.Arg410Gly (rs2077408020) и p.Met412Val (rs1225797407), в экзоне 12 p.Leu605Val (rs879255031), p.Leu605Arg (rs875989932) и p.Ala612Gly (rs377449975).

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* (Zakharova F.M. et al., 2005; Мандельштам М.Ю., 2003; Мешков А.Н. и др., 2003; Мешков А.Н. и др., 2005; Малышев П.П. и др., 2006).

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 (Miroshnikova V.V. et al., 2021) и обозначен в базе данных ClinVar (allele ID 847210) как «вероятно патогенный» (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/841257> от 01.06.2021). Секвенирование гена *LDLR* является высокоэффективным методом обследования для выявления лиц с предрасположенностью к формированию гиперхолестеринемии в популяции и может использоваться в ретроспективных исследованиях.

На следующем этапе выполнена идентификация спектра вариантов в гене *LDLR* (n=20) в популяционной выборке лиц с нормальными и низкими значениями ОХС. У 7 (35%) обследованных лиц в экзоне 2 определен синонимичный вариант rs2228671 (p.Cys27=, NC_000019.10:g.11100236C>T) в гетерозиготном варианте. По данным базы ClinVar вариант относится к доброкачественным. Частота редкого аллеля Т составляет 10% в европеоидных популяциях (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2228671> от 01.06.2021). В этой позиции описан также патогенный вариант p.Cys27Ter (C/A), который может быть причиной развития семейной гиперхолестеринемии (Bertolini S. et al., 2013; Laurie A.D. et al., 2004).

У 9 (45%) пациентов описан вариант IVS7+10 (rs12710260, NC_000019.9:g.11221457G>C). Частота редкого аллеля С=33% (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12710260> от 01.06.2021). В этой позиции описан также патогенный вариант CS040544 (G/A), который ассоциирован с развитием семейной гиперхолестеринемии (Bertolini S. et al., 2013; Laurie A.D. et al., 2004; Safarova M.S. et al., 2017).

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 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs5929> от 01.06.2021).

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*.

Анализ ассоциации вариантов генов липидного метаболизма с рядом биохимических показателей крови

В популяционной группе европеоидного населения Западной Сибири выполнен анализ ассоциации rs429358 и rs7412 (ε2, ε3, ε4) гена *APOE* (n=894) с уровнями липидов крови (ОХС, ХС-ЛВП, ХС ЛНП, ТГ) и индексом атерогенности (таблица 3). Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов были статистически значимы (p=0,0001). Максимальное значение среднего уровня ОХС выявлено для генотипа ε2/ε2. Минимальные значения среднего уровня ОХС определяются при генотипе ε2/ε3, статистически значимые при попарном сравнении с генотипами ε2/ε2 (p=0,002), ε3/ε3 (p=0,002) и ε3/ε4 (p=0,0001). Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин (p=0,001) и для женщин (p=0,007).

Различия в средних уровнях ХС-ЛВП у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически не значимы (p=0,776).

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 ε4/ε4.

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 $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). Различия средних уровней ХС-ЛНП у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,001$), но не достигали уровня принятой в исследовании статистической значимости для женщин ($p=0,022$).

Таблица 3 – 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 ТГ у носителей разных генотипов полиморфизма 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 $\epsilon 4/\epsilon 4$ ($p=0,0001$). Различия средних уровней ТГ у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,001$) и для женщин ($p=0,001$).

Различия в средних уровнях индекса атерогенности (ИА) у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы ($p=0,0001$). Различия средних уровней ИА у носителей разных генотипов полиморфизма кодирующей части гена *APOE* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,004$), но не достигали уровня принятой в исследовании статистической значимости для женщин ($p=0,038$).

В результате проведенного исследования выявлена статистически значимая ассоциация между генотипами полиморфизма 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 $\epsilon 4/\epsilon 4$.

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 $\epsilon 3/\epsilon 4$ ($p=0,005$). 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.

Выполнен анализ ассоциации варианта rs708272 гена *CETP* ($n=869$) с показателями ОХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ, ИА (таблица 4).

Различия в средних уровнях ОХС у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически не значимы, как общей группе ($p=0,217$), так и при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,298$) и для женщин ($p=0,59$).

Различия в средних уровнях ХС-ЛВП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически значимы ($p=0,0001$). Различия средних уровней ХС-ЛВНП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически значимы при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,0001$), но не достигали уровня принятой в исследовании статистической значимости для женщин ($p=0,041$).

Таблица 4 – Уровни общего ХС, ХС-ЛВП, ХС-ЛНП, ТГ крови и индекс атерогенности для генотипов варианта rs708272 гена *CETP*

Генотипы	ОХС, ммоль/л	ХС- ЛВП, ммоль/л	ХС-ЛНП, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	Индекс атерогенности, ед
AA	6,7 $\pm$ 2,2	1,638 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 1,7
AG	6,6 $\pm$ 2,2	1,526 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 1,7	1,7 $\pm$ 1,1	3,0 $\pm$ 1,7
GG	6,4 $\pm$ 2,2	1,404 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 1,7	1,6 $\pm$ 0,9	3,1 $\pm$ 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-ЛНП у носителей разных генотипов варианта rs708272 гена *CETP* были статистически не значимы ($p=0,758$), в том числе и при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,883$) и для женщин ($p=0,848$). Различия в средних уровнях ТГ были статистически не значимы ($p=0,155$), в том числе, при

проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,1$) и для женщин ($p=0,48$). Различия в средних значениях индекса атерогенности были статистически не значимы как в общей группе ($p=0,218$), так и при проведении анализа отдельно для мужчин ($p=0,305$) и для женщин ($p=0,332$).

Данные результаты не противоречат ранее проведенным исследованиям, например, в работе Gilberto Vargas-Alarcon и соавт., была показана ассоциация аллеля G с пониженной концентрацией ХС-ЛВП и повышенным риском острого коронарного синдрома ($ОШ = 1.45$, $p = 0.036$) (Vargas-Alarcon G. et al., 2018). В 2016 г Guo и соавторами на основании мета-анализа была 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 (Guo S.X. et al., 2016). 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 (Khera A.V. et al., 2011).

При анализе ассоциации вариантов rs320 (HindIII; T/G) гена *LPL* и rs5888 гена *SCARB1* показано, что различия в средних уровнях показателей липидного профиля крови и индекса атерогенности у носителей разных генотипов были статистически не значимы.

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

Генетические компоненты формирования промежуточных фракций липопротеинов низкой плотности

У обследованных лиц с гиперхолестеринемией более 8,0 ммоль/л (309 мг/дл) максимальное количество частиц ЛНП отмечено в точке $249,9 \pm 4,3 \cdot 10^{-10}$ м. У обследованных лиц с уровнем ОХС 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 находилось в точке $247,2 \pm 3,1 \cdot 10^{-10}$ м. Максимальное количество частиц ЛНП статистически значимо различалось между тремя группами (таблица 5).

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. 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 ЛНП у обследованных лиц с гиперхолестеринемией.

Таблица 5 – Характеристика субфракционного профиля частиц ЛНП ($M\pm m, \sigma$)

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, $10^{-10}M$	249,9 $\pm$ 4,3	237,8 $\pm$ 3,4*	247,2 $\pm$ 3,1	2 vs 1 и 3
Начало профиля ЛНП, $10^{-10}M$	312,5 $\pm$ 3,4*	320,2 $\pm$ 2,9	322,8 $\pm$ 2,4	1 vs 3
Конец профиля ЛНП, $10^{-10}M$	175,8 $\pm$ 3,8**	162,9 $\pm$ 2,6	169,3 $\pm$ 2,9	1 vs 2
Ширина профиля ЛНП, $10^{-10}M$	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; * $p<0,05$, ** $p<0,01$

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. 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 ($p<0,05$).

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 гиперхолестеринемией, 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.

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.

Таргетное высокопроизводительное секвенирование генов, ассоциированных с семейной гиперхолестеринемией

Патогенетически значимые варианты в генах, ассоциированных СГХС, определены у 47,5% обследованных лиц.

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 (таблица 6).

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. Наиболее распространенный вариант – rs121908038 – встречался в трех неродственных семьях.

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*. В первом случае у пациентки Р52 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 6). 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 повышенные уровни ОХС. Материал родственников не был доступен для исследования.

Таблица 6 – Варианты в гене *LDLR* у пациентов с СГХС

Номер позиции в референсной последовательности	Позиция на хромосоме (GRCh38)	Замена нуклеотидов	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля по базе GnomAD	Клиническое значение
rs121908038	19:11113293	c.1202T>A	p.Leu401His	НД	LP
rs137853964	19:11129602	c.2479G>A	p.Val827Ile	A=0.001006	LP
rs28942078	19:11113376	c.1285G>A	p.Val429Met	A=0.000012	P/LP
rs539080792	19:11221396	c.1009G>A	p.Glu337Lys	A=0.000104	VUS
rs570942190	19:11113337	c.1246C>T	p.Arg416Trp	T=0.000024	NR
rs755757866	19:11110730	c.1019G>T	p.Cys340Tyr	T=0.000008	LP
rs761954844	19:11110697	c.986G>A	p.Cys329Tyr	A=0.000016	LP
rs879254566	19:11105440	c.534TT>G	p.Asp178Glu	НД	P/LP
rs879254721	19:11107496	c.922G>A	p.Glu308Lys	НД	P
rs879254980	19:11116179	c.1672G>T	p.Glu558Ter	НД	P
rs879255191	19:11128090	c.2389+5G>A	-	НД	C
rs875989907	19:11106666	c.796G>A	p.Asp266Asn	A=0.000012	P
rs879254769	19:11110765	c.1054T>C	p.Cys352Ser	НД	LP
rs875989894	19:11213415	c.266G>C	p.Cys89Ser	НД	P/LP
НД	19:11222252	c.1123T>G	p.Tyr375Asp	НД	NV

Примечание: P – pathogenic, LP – likely pathogenic, VUS – variant uncertain significance, NR – not reported, C – conflicting interpretations of pathogenic, NV – novel variant, НД – нет данных

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 6). 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 (Pamplona-Cunha H. et al., 2020).

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 ИМ. 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 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).

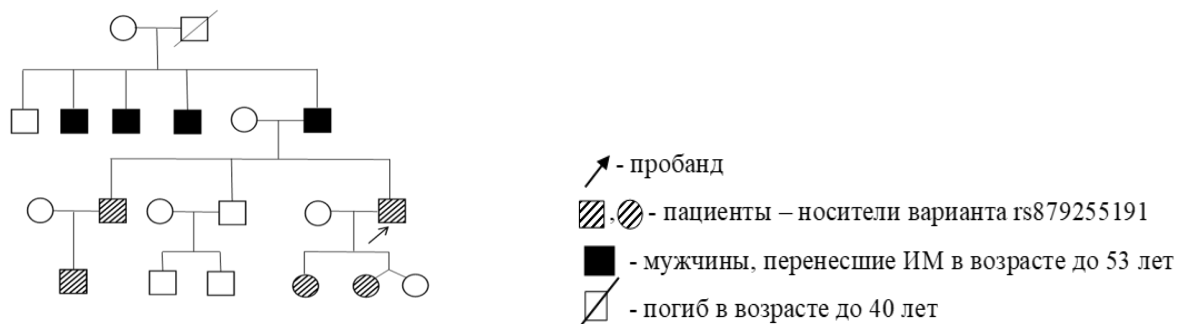


Рисунок 1 – Редкий вариант в регуляторном районе гена *LDLR*

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 (<http://tools.genes.toronto.edu/>). 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 был описан у больных СГХС, в том числе в России (Meshkov A.N. et al., 2009). Вариант rs879255191 выявлен также у родного брата (Р81) и племянника пробанда (Р82), 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.

Клинический случай: гетерозиготная форма СГХС в молодом возрасте

Пациентка, 16 лет, 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 ССЗ 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 поставлен пациентке согласно критериям руководства по семейной гиперхолестеринемии (ХС-ЛНП $\geq$ 4,9 ммоль/л в двух последовательных анализах на фоне соблюдения гиполипидемической диеты в течение 3 месяцев) (М.В. Ежов, 2019).

У пациентки выявлена замена 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 2).

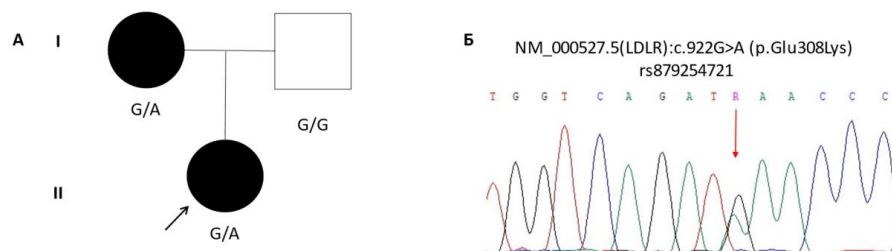


Рисунок 2 – А. Семейная история и миссенс вариант rs879254721 гена *LDLR*. Черным цветом выделены члены семьи с фенотипом СГХС. G/A- носитель миссенс мутации p.Glu308Lys в гетерозиготном варианте; G/G – носитель дикого варианта.

Б. Электрофореграмма последовательности с вариантом rs879254721 гена *LDLR*.

В рамках проведения каскадного скрининга у матери пробанда выявлен вариант rs879254721 в гене *LDLR* в гетерозиготном варианте.

После подтверждения диагноза СГХС пациентке назначена терапия липид-снижающим препаратом группы статинов, 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 (Nordestgaard B.G. et al., 2013). 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.

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. Проведенный анализ выявил делеции в образцах ДНК двух неродственных пациентов. В первом случае делеция в гетерозиготной форме NM_000527.4:c.(67+1_68-1)(1586+1_1587-1)del затрагивала участок со 2 по 10 экзоны (рисунок 3а), 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 3б).

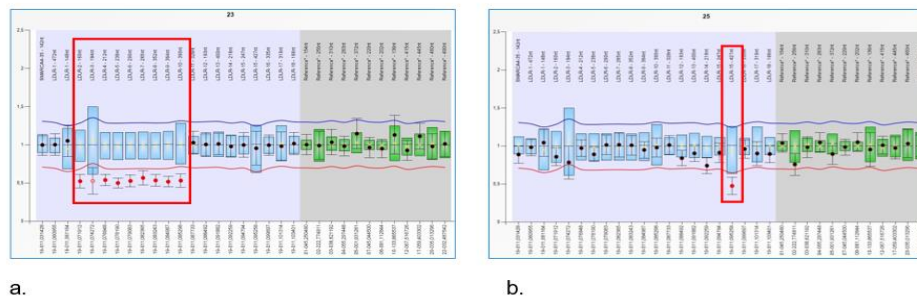


Рисунок 3 – Делеция экзонов *LDLR* 2–10 (а) и экзона 15 (б) у пациентов с СГХС

У пациентки Р33 (31 год) с делецией 2-10 экзон уровень ОХС был 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 (Marduel M. et al., 2010).

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 ранее (Koivisto P.V. et al., 1992).

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

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 (Таблица 7).

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 (ИМ) в 50 лет и умер от второго ИМ 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 rs5742904 – уровень общего холестерина составлял 7,5 ммоль / л, ХС-ЛПНП 5,7 ммоль / л, по критериям DLCN – 11 баллов. Клинический эффект rs5742904 обозначен как патогенный (27 исследований) по базе данных ClinVar (Landrum M.J. et al., 2018).

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 ОХС 8,3 ммоль/л, ХС-ЛНП – 5,4 ммоль/л, DLCN – 3 балла (Таблица 7). Частота редкого аллеля C=0.002223 для European (non-Finnish), по данным базы GnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>). 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 была показана ассоциация rs145164937 с ХС-не-ЛВП (Helgadottir A., 2020).

При анализе результатов таргетного высокопроизводительного секвенирования в гене *APOC3* выявлен вариант rs138326449 (IVS2+1G>A) в гетерозиготной форме (Таблица 7). 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 (Jorgensen A.B. et al., 2014). 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 ТГ (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 7). Частота редкого аллеля C=0.0001 для European (non-Finnish), по данным базы GnomAD. Клиническое значение по данным базы ClinVar указано как патогенное. Rs118204077 известный патогенный вариант HGMD ID CM941054. При анализе с использованием PolyPhen-2 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 (Surendran R.P. et al., 2012; Ma Y. et al., 1994).

Таблица 7 – Редкие варианты в генах *APOB*, *ABCG5*, *APOC3*, *LPL*, *SREBF1* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Вариант	Позиция на хромосоме	Замена нуклеотидов	Замена аминокислот	Частота редкого аллеля по данным GnomAD	Клиническое значение по данным ClinVar
<i>APOB</i>					
rs5742904	2:21006288	c.10580G>A	p.Arg3527Gln	T=0.000275	P
<i>ABCG5</i>					
rs145164937	2:43832056	c.293C>G	p.Ala98Gly	C=0.002223	C
<i>APOC3</i>					
rs138326449	11:116830638	c.55+1G>A	-	C=0.002244	C
<i>LPL</i>					
rs118204077	8:19955873	c.808C>T	p.Arg270Cys	C=0.0001	P
<i>SREBF1</i>					
rs115855236	17:17820281	c.422C>T	p.Pro141Leu	A=0.001210	NR

Примечание: P – pathogenic, C – conflicting interpretations of pathogenic, NR – not reported

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 7). 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*.

Молекулярно-генетические исследования СГХС в России проводятся более 30 лет в разных регионах страны (Карпов Y.A. et al., 2005). 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 (Miroshnikova V.V. et al., 2021; Averkova A.O. et al., 2020). Применение этого метода позволило бы объединить усилия врачей и исследователей различных регионов в изучении СГХС. 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 с СГХС продемонстрировано преобладание гетерозиготной формы СГХС, обусловленной в 73% случаев редкими вариантами в гене *LDLR*. В работе выявлены два новых варианта в гене *LDLR*. У пациентов с семейной гиперхолестеринемией выявлены редкие патогенные и вероятно патогенные варианты в изучаемых генах.

Результаты полногеномного секвенирования ДНК в группе пациентов с семейной гиперхолестеринемией

Из пациентов с фенотипом СГХС, которые по результатам таргетного секвенирования и анализа MLPA не были носителями патогенных вариантов в изученных генах липидного обмена, с использованием алгоритма машинного обучения было выбрано пять человек с наиболее тяжелым течением СГХС для полногеномного секвенирования. У трех пациентов выявлено четыре варианта, имеющих частоту редкого аллеля менее 0.01 %, в генах, ассоциированных с липидным метаболизмом.

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). Вариант имеет неопределенную клиническую значимость (критерий патогенности PM2).

Описан новый миссенс-вариант в гене *LRP1B* c.10313C>G p.Pro3438Arg в гетерозиготном состоянии (критерии патогенности PM2, PP3, BP1).

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 обнаружены). В отношении фенотипа СГХС мы отнесли обнаруженную замену к категории вариантов с неизвестной клинической значимостью (критерий патогенности PM2).

У одного из обследованных пациентов выявлена гетерозиготная однонуклеотидная делеция rs753876598, (NM_000078.3: c.165del) в гене *CETP*. Варианты с потерей функции в гене *CETP* ассоциированы с уровнем ХС-ЛВП (Millwood et al., 2018; Li et al., 2021). По совокупности критериев оценки патогенности (PM2, PVS1) вариант определен как вероятно патогенный.

Полноэкзомное секвенирование ДНК пациентов с коронарным атеросклерозом

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. 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. У пациента (P_ka01) также определено носительство ε2 аллеля гена *APOE*.

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 (Daneshpour M.S. et al., 2018). 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.

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

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. 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 и вид бляшек был однороден для каждого из пациентов по результатам гистологического исследования.

В результате исследования были получены данные статистически значимых различий по 208 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*.

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*. 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 повышение экспрессии генов *ABCA1*, *LIPA*, *LPL*, *SCARB1* и *STAP1*. 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*.

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). 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 аполипопротеинов C1 и E (таблица 8).

Таблица 8 – Экспрессия генов аполипопротеинов C1 и E в атеросклеротических бляшках и в тканях интактных коронарных сосудов

Ген	Локус	Экспрессия в интактных коронарных сосудах, FPKM	Экспрессия в атеросклеротических бляшках, FPKM	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

Примечание: FPKM - fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped (фрагменты на тысячу пар оснований транскрипта на миллион картированных прочтений)

Полученные нами данные о дифференциальной экспрессии генов аполипопротеинов C1 и E в атеросклеротических бляшках согласуются с ранее опубликованными результатами (Sulkava, M. et al., 2017), 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.

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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный анализ показал, что европеоидная популяция Западной Сибири по частоте аллелей и генотипов изученных вариантов генов липидного обмена сопоставима с такими странами, как Франция, Италия, Чехия, Польша, но в отличие от этих стран, частота распространенности ССЗ в Западной Сибири выше (Lakunchykova O. Et al., 2020). Несмотря на то, что в исследовании не выявлены статистически значимые отличия в частоте аллелей и генотипов изученных вариантов 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.

Проведенный анализ ассоциации вариантов генов липидного обмена с показателями липидного профиля крови подтверждает перспективность изучения ассоциаций полиморфных вариантов генов с факторами риска ССЗ для изучения и оценки индивидуального риска развития атеросклероза с учетом имеющегося мирового опыта.

Комплексное использование клинических критериев, высокопроизводительного секвенирования и MLPA позволяет выявить максимальное число пациентов – носителей редких патогенных вариантов в широком спектре генов липидного обмена и изучить фенотипические особенности семейной гиперхолестеринемии. Своевременно поставленный диагноз позволяет не только назначить адекватную липидснижающую терапию и снизить риск развития ССЗ у пробанда, но и обследовать его родственников с целью диагностики и первичной профилактики ССЗ на ранних доклинических стадиях развития патологического процесса.

Обнаружение полного пула транскриптов атеросклеротических бляшек и сравнительный анализ по количественному и качественному составу транскриптов между различными типами бляшек позволяет выявить маркеры дестабилизации атеросклеротического процесса 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 перцентиля) 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*: с.2430-1G>A; ранее не описанная однонуклеотидная делеция гена *SIDT1*: с.2426del (p.Leu809CysfsTer2); новый миссенс-вариант с.10313C>G (p.Pro3438Arg) в гене *LRP1B* и вариант однонуклеотидной делеции rs753876598: с.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, не 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Воевода М.И., Куликов И.В., Шахтшнейдер Е.В., Максимов В.Н., Пилипенко И.В., Терещенко И.П., Кобзев В.Ф., Ромащенко А.Г., Никитин Ю.П. Популяционное исследование спектра мутаций гена рецептора липопротеинов низкой плотности в российской популяции // Генетика – 2008 – №10 – С. 1191-1194. DOI:10.1134/S1022795408100074. РИНЦ, Scopus
2. Шахтшнейдер Е.В., Куликов И.В., Иванова М.В., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма гена аполипопротеина А1 с липидным профилем сыворотки крови. //Атеросклероз. 2010. №2.-С.5-9. РИНЦ
3. Шахтшнейдер Е.В., Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Куликов И.В., Иванова М.В., Воевода М.И. Полиморфизм гена аполипопротеина Е у мужчин с коронарным атеросклерозом в Сибири. //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. -2010.- №9. – С.324-327. DOI: 10.1007/s10517-011-1141-2. РИНЦ, Scopus
4. Рагино Ю.И., Чернявский А.М., Еременко Н.В., Шахтшнейдер Е.В., Полонская Я.В., Цымбал С.Ю., Иванова М.В., Воевода М.И. Ключевые лабораторно-диагностические биомаркеры коронарного атеросклероза. //Кардиология. - 2011.- №3. – С.42-46. РИНЦ, Scopus
5. Шахтшнейдер Е.В., Куликов И.В., Максимов В.Н., Рагино Ю.И., Иванова М.В., Воевода М.И. Полиморфизм гена *СЕТР* в европеоидной популяции западной Сибири и группах, контрастных по уровню общего холестерина сыворотки //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2014 – №3 – С. 343-347. РИНЦ, Scopus
6. Шахтшнейдер Е.В., Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Воевода М.И. Ассоциация *HindIII* полиморфизма гена *LPL* с формированием липидного профиля сыворотки // Атеросклероз – 2014 – Том 10 - №2, стр. 24-31. РИНЦ
7. Воевода М.И., Шахтшнейдер Е.В., Макаренкова К.В., Иваношук Д.Е., Орлов П.С., Рагино Ю.И. Каскадный скрининг семейной гиперхолестеринемии. Атеросклероз, 2015. Т. 10. №4. С. 5-10. РИНЦ
8. Астракова К.С., Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Орлов П.С., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма гена *PCSK9* с показателями липидного профиля в российской популяции. Атеросклероз. 2016. Т. 12. № 2. С. 18 -24. РИНЦ
9. Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Макаренкова К.В., Орлов П.С., Тимощенко О.В., Бажан С.С., Никитин Ю.П., Воевода М.И. Каскадный генетический скрининг в диагностике гетерозиготной формы семейной гиперхолестеринемии: клинический случай. Российский кардиологический журнал 2017, 6 (146): 178–179. №2. С. 160-164. РИНЦ, Scopus
10. Шахтшнейдер Е.В., Макаренкова К.В., Астракова К.С., Иваношук Д.Е., Орлов П.С., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Таргетное секвенирование гена *PCSK9* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в России. Кардиология. 2017. Т. 57. № 6. С. 46-51. РИНЦ, Scopus

11. Иваношук Д.Е., Шахтшнейдер Е.В., Орлов П.С., Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Чернявский А.М., Воевода М.И. Анализ дифференциальной экспрессии матричных металлопротеиназ в стабильной и нестабильной атеросклеротических бляшках методом полногеномного секвенирования РНК: пилотное исследование. Российский кардиологический журнал. 2018. Т. 23. № 8. С. 52-58. DOI: 10.15829/1560-4071-2018-8-52-58. РИНЦ, Scopus
12. Шахтшнейдер Е.В., Орлов П.С., Щербакова Л.В., Иваношук Д.Е., Малютин С.К., Максимов В.Н., Гафаров В.В., Воевода М.И. Панель генетических маркеров для анализа риска отдаленного неблагоприятного прогноза сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклероз. 2018. Т. 14. № 3. С. 12-19. DOI: 10.15372/ATER20180302. РИНЦ
13. 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., Шахтшнейдер 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. и др. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. Атеросклероз и дислипидемии. 2019. № 1 (34). С. 5-43. РИНЦ
14. Ожиганова Н.В., Мустафина С.В., Шахтшнейдер Е.В. Ассоциация вариантов гена *CETP* с изменениями липидного профиля при различных типах питания. Атеросклероз. 2020. №1, С. 53-58. DOI: 10.15372/ATER20200107. РИНЦ
15. Широкова Н.С., Михайлова С.В., Иваношук Д.Е., Шахтшнейдер Е.В. Гены аполипопротеинов *APOA5* и *APOL* как регуляторы метаболизма липопротеинов. Атеросклероз. 2020. Т. 16. № 3. С. 53-60. РИНЦ
16. Михайлова С.В., Иваношук Д.Е., Широкова Н.С., Шахтшнейдер Е.В. Полиморфизм гена *APOA5* у пациентов с первичной гиперлипидемией. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020. Т. 9. № 2. С. 38-44. РИНЦ, Scopus
17. Стрюкова Е.В., Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Мурашов И.С., Волков А.М., Кургузов А.В., Чернявский А.М., Валеев Э.С., Максимов В.Н., Каштанова Е.В. Анализ полиморфизма гена *F5* у мужчин с коронарным атеросклерозом с использованием метода полноэкзомного секвенирования. Атеросклероз. 2021;17(1):29-37. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-29-37>. РИНЦ
18. Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Рагино Ю.И., Фишман В.С., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Чернявский А.М., Мурашов И.С., Воевода М.И. Анализ дифференциальной экспрессии генов липидного обмена в атеросклеротических бляшках у пациентов с коронарным атеросклерозом. Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2021. 36(4):156-163. <https://doi.org/10.29001/2073-8552-2021-36-4-156-163>. РИНЦ, Scopus
19. Тимощенко О.В., Иваношук Д.Е., Семаев С.Е., Латынцева Л.Д., Шахтшнейдер Е.В. Молекулярно-генетическая диагностика гетерозиготной формы семейной

гиперхолестеринемии в молодом возрасте: клинический случай. Атеросклероз. 2022. 18(1):76-80. DOI 10.52727/2078-256X-2022-18-1-76-80. РИНЦ

20. Иванощук Д.Е., Колкер А.Б., Тимощенко О.В., Семаев С.Е., Шахтштейндер Е.В. Поиск новых генов, ассоциированных с фенотипом семейной гиперхолестеринемии, методами полногеномного секвенирования и машинного обучения. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. 27(5): 522-529. DOI 10.18699/VJGB-23-63. РИНЦ, Scopus

Статьи в зарубежных рецензируемых журналах:

21. Semaev S., Shakhtshneider E., Orlov P., Ivanoshchuk D., Malyutina S., Gafarov V., Ragino Y., Voevoda M. Association of rs708272 (*CETP* gene variant) with lipid profile parameters and the risk of myocardial infarction in the white population of Western Siberia. Biomolecules. 2019. Т. 9. № 11. С. 739. DOI: 10.3390/biom9110739. WoS, Scopus. Q1

22. Mikhailova S., Ivanoshchuk D., Timoshchenko O., Shakhtshneider E. Genes potentially associated with familial hypercholesterolemia. Biomolecules 2019, 9, 807. doi:10.3390/biom9120807. WoS, Scopus. Q1

23. Semaev S., Shakhtshneider E. Genetic Risk Score for Coronary Heart Disease: Review. J. Pers. Med. 2020, 10, 239, 1-18. doi:10.3390/jpm10040239. WoS, Scopus. Q1

24. Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Timoshchenko O., Orlov P., Semaev S., Valeev E., Goonko A., Ladygina N., Voevoda M. Analysis of Rare Variants in Genes Related to Lipid Metabolism in Patients with Familial Hypercholesterolemia in Western Siberia (Russia). J. Pers. Med. 2021, 11, 1232. <https://doi.org/10.3390/jpm11111232>. WoS, Scopus. Q2

25. Semaev S., Shakhtshneider E., Shcherbakova L., Ivanoshchuk D., Orlov P., Malyutina S., Gafarov V., Ragino Y., Voevoda M. Associations of *APOE* Gene Variants rs429358 and rs7412 with Parameters of the Blood Lipid Profile and the Risk of Myocardial Infarction and Death in a White Population of Western Siberia. Curr. Issues Mol. Biol. 2022, 44(4), 1713-1724; <https://doi.org/10.3390/cimb44040118>. Scopus. Q3

26. Timoshchenko O.V., Ivanoshchuk D. E., Semaev S. E., Orlov P.S., Zorina V.V., Shakhtshneider E.V. Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia in Children and Young Adults. Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(1), 314. DOI: 10.3390/ijms25010314. WoS, Scopus. Q1

Свидетельства о государственной регистрации баз данных:

27. Воевода М.И., Шахтштейндер Е.В., Иванощук Д.Е., Орлов П.С., Макаренкова К.В. генетические маркеры у пациентов с семейной гиперхолестеринемией в регуляторных и не регуляторных областях генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2017620408, 07.04.2017. Заявка №2016621487 от 10.11.2016.

28. Максимов В.Н., Иванова А.А., Шахтштейндер Е.В., Малютин С.К., Воевода М.И. Частоты распространённых полиморфизмов генов в популяции г. Новосибирска. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019620721, 07.05.2019. Заявка №2019620633 от 23.04.2019.

29. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Рагино Ю.И. Экзомы пациентов с коронарным атеросклерозом. Свидетельство о регистрации базы данных 2020622711, 21.12.2020. Заявка №2020622673 от 14.12.2020.

30. Колкер А.Б., Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Тимощенко О.В., Рагино Ю.И. База данных ансамбля деревьев для прогнозирования семейной гиперхолестеринемии на основе машинного обучения и секвенирования нового поколения. Свидетельство о регистрации базы данных 2022623708, 27.12.2022. Заявка №2022623680 от 14.12.2022.

Материалы конгрессов и конференций

31. Шахтшнейдер Е.В., Куликов И.В., Иванова М.В., Воевода М.И. Молекулярно-генетические аспекты формирования атерогенных дислипидемий в Сибири. // II Съезд терапевтов Сибири и Дальнего Востока. 2010. С. 132.

32. Shakhtshneider E.V., Allakhverdyan A.A., Kulikov I.V., Maksimov V.N., Romashchenko A.G., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. The influence of genes on lipid metabolism in West Siberia caucasian population. //Atherosclerosis Supplements 11, №2, 78th European Atherosclerosis Society Congress. Hamburg. Germany. 2010. P.544.

33. Voevoda M.I., Shakhtshneider E.V., Kulikov I.V., Ivanova M.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K. Rare polymorphism GLN3405GLU of apolipoprotein B in populations of North Asia and its association with plasma lipids levels // Human genome meeting 2011 – Dubai – March 14-17 – P. 283.

34. Shakhtshneider E., Ragino Y., Polonskaya Y., Kashtanova E., Kulikov I., Voevoda M. Atherogenic subfractional blood lipoproteins profile and its genetic markers in West Siberia //Atherosclerosis Supplements 12, №1, 79th European Atherosclerosis Society Congress - Gothenburg, Sweden - June 26-29, 2011 – P. 126.

35. Shakhtshneider E.V., Kulikov I.V., Romashchenko A.G., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. The polymorphism of cholesterol ester transfer protein gene and lipid profile in caucasian population of West Siberia // 80th European Atherosclerosis Society Congress - Milan, Italy - May 26-29, 2012 – P. 532.

36. Shakhtshneider E.V., Kulikov I.V., Maksimov V.N., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. The polymorphism of apolipoprotein CIII gene and lipid profile in Caucasian population of West Siberia // Lyon, France, 81st EAS Congress, June 2-5, 2013. P.1110.

37. Voevoda M.I., Shakhtshneider E.V., Kulikov I.V., Maksimov V.N., Ivanova M.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K. The polymorphism of apolipoprotein E gene and lipid profile in Caucasian population of West Siberia // Lyon, France, 81st EAS Congress, June 2-5, 2013. P.1114.

38. Voevoda M.I., Shakhtshneider E.V., Ivanova M.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K. Rare polymorphism GLN3405GLU of apolipoprotein B in caucasian population of West Siberia and its association with plasma lipids levels // 82nd Annual Congress of the EAS, Madrid, Spain, May 31st-June 3rd – 2014 Atherosclerosis, Volume 235, Issue 2, August 2014, Page e100.

39. Voevoda M.I., Shakhtshneider E.V., Orlov P.S., Ivanoshchuk D.E., Ivanova M.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K. The mutation R3500Q of apolipoprotein B in caucasian

population of West Siberia and in patients with highest total cholesterol level // 82nd Annual Congress of the EAS, Madrid, Spain, May 31st-June 3rd – 2014 – Atherosclerosis, Volume 235, Issue 2, August 2014, Page e100.

40. Shakhtshneider E.V., Ragino Yu.I., Polonskaya Ya.V., Kashtanova E.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. The HindIII polymorphism of lipoprotein lipase gene and lipid profile in caucasian population of West Siberia // 82nd Annual Congress of the EAS, Madrid, Spain, May 31st-June 3rd – 2014 – Atherosclerosis, Volume 235, Issue 2, August 2014, Page e100-101.

41. Шахтшнейдер Е.В., Орлов П.С., Иванощук Д.Е., Воевода М.И. Каскадный генетический скрининг семейной гиперхолестеринемии // Сборник тезисов докладов – Российский национальный конгресс кардиологов, Казань, 24-26 сентября 2014 – Стр. 516.

42. Shakhtshneider E.V., Ragino Yu.I., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. Scavenger receptor class B type 1 gene rs5888 single nucleotide polymorphism and lipid profile in Caucasian population of West Siberia // 83nd EAS Congress, Glasgow, UK, March 22-25, 2015 – P.126.

43. Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Pilipenko I.V., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. Screening for *LDLR* gene mutations responsible for hypocholesterolemia in Russian population // 83nd EAS Congress, Glasgow, UK, March 22-25, 2015 – P.128.

44. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Орлов П.С., Макаренкова К.В., Астракова К.С., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Структурные маркеры генов *APOB*, *LDLR*, *PCSK9* в развитии атеросклероза // Материалы Российского национального конгресса кардиологов, 22-24 сентября 2015 г., Москва – С. 672-673.

45. Шахтшнейдер Е.В., Макаренкова К.В., Иванощук Д.Е., Орлов П.С., Воропаева Е.Н., Рагино Ю.И., Воевода М.И. Каскадный генетический скрининг семейной гиперхолестеринемии: опыт применения в России. Материалы конгресса, Российский национальный конгресс кардиологов. // Кардиология 2016: вызовы и пути решения, 20—23 сентября 2016 г. Екатеринбург. – С. 539-540.

46. Ivanoshchuk D., Shakhtshneider E., Makarenkova K., Orlov P., Ragino Y., Voevoda M. Targeted next-generation sequencing of the *LDLRAP1* gene in patients with familial hypercholesterolemia. // Atherosclerosis. - 2016. - Vol. 252. - P. e32-e33.

47. Shakhtshneider E., Makarenkova K., Ivanoshchuk D., Orlov P., Ragino Y., Voevoda M. Cascade genetic screening for familial hypercholesterolemia in West Siberia. Atherosclerosis. - 2016. - Vol. 252. - P. e29.

48. Astrakova K., Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Ragino Yu., Voevoda M. The R46L polymorphism of *PCSK9* gene and lipid profile in caucasian population of Russia. // Atherosclerosis. - 2016. - Vol. 252. - P. e40.

49. Voevoda M., Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Orlov P., Makarenkova K., Ragino Yu. Analysis of lipid metabolism genes variability in patients with familial hypercholesterolemia in Russia using targeted high throughput resequencing. Anitschkow Days. Symposium of the International Atherosclerosis Society June 2–4, 2016, St. Petersburg, Russia. P. 64.

50. Ivanoshchuk D., Shakhtshneider E., Makarenkova K., Orlov P., Ragino Yu., Voevoda M. Targeted next-generation sequencing of the *APOB* gene in patients with familial hypercholesterolemia Anitschkow Days. Symposium of the International Atherosclerosis Society June 2–4, 2016, St. Petersburg, Russia. P. 206.

51. Shakhtshneider E.V., Ragino Yu.I., Maksimov V.N., Nikitin Yu.P., Malyutina S.K., Voevoda M.I. Sterol regulatory element binding transcription factor 2 gene rs2228314 single nucleotide polymorphism and lipid profile in Caucasian population of west Siberia Anitschkow Days. Symposium of the International Atherosclerosis Society June 2–4, 2016, St. Petersburg, Russia. P. 218.

52. Shakhtshneider E., Orlov P., Ivanoshchuk D., Makarenkova K., Ragino Yu., Voevoda M. Analysis of the *LDLR* gene variability in patients with familial hypercholesterolemia in Russia using targeted high throughput resequencing. *Atherosclerosis*. 2017. Vol. 263, e227.

53. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Рагино Ю.И., Полонская Я.В., Чернявский А.М., Воевода М.И. Анализ транскриптомного профиля нестабильной атеросклеротической бляшки. Национальный Конгресс кардиологов. 2017. Санкт-Петербург. Стр. 440.

54. Shakhtshneider E., Ivanoshchuk D., Makarenkova K., Orlov P., Voevoda M. Clinical case: The development of heterozygous familial hypercholesterolemia in a patient with rs879255191 in *LDLR* gene. *Atherosclerosis*, Volume 275, August 2018, Page e179.

55. Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Mikhailova S., Fishman V., Ragino Y.I., Polonskaya Ya.V., Kashtanova E.V., Chernyavsky A., Murashov I., Voevoda M.I. Analysis of differential expression of matrix metalloproteinases genes in stable and unstable atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2019. T. 287. С. e258.

56. Shakhtshneider E.V., Ivanoshchuk D.E., Orlov P.S., Timoshchenko O., Voevoda M.I. Analysis of the *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* and *LDLRAP1* genes variability in patients with familial hypercholesterolemia in West Siberia using targeted high throughput sequencing. *Atherosclerosis*. 2019. T. 287. С. e285.

57. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Фишман В.С., Белокопытова П.С., Орлов П.С., Тимошенко О.В., Воевода М.И. Таргетное секвенирование генов *LDLR*, *APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1* и кластера генов *APOA5-A4-C3-A1* у пациентов с семейной гиперхолестеринемией. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2019. Т. 8. № S3-2. С. 71.

58. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Орлов П.С., Тимошенко О.В., Воевода М.И. Молекулярно-генетическая диагностика семейной гиперхолестеринемии: опыт научно-клинического центра липидологии г. Новосибирска. *Терапия*. 2020. Т. 6. № S. С. 92-93.

59. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Воевода М.И. Современные методы молекулярно-генетической диагностики семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз*. 2021. Т. 17. № 3. С. 54.

60. Шахтшнейдер Е.В., Иванощук Д.Е., Рагино Ю.И., Валеев Э.С., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Чернявский А.М., Мурашов И.С., Воевода М.И.

Высокопроизводительные молекулярно-генетические технологии для поиска новых этиопатогенетических факторов развития атеросклероза. Атеросклероз. 2021. Т. 17. № 3. С. 83-84.

61. Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Рагино Ю.И., Валеев Э.С., Полонская Я.В., Каштанова Е.В., Чернявский А.М., Мурашов И.С., Воевода М.И. Анализ спектра вариантов в генах липидного обмена у пациентов с коронарным атеросклерозом методом полноэкзомного секвенирования. Материалы Российского национального конгресса кардиологов. 29 сентября - 1 октября 2022 года, Казань, 2022. С. 640.

62. Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Тимощенко О.В., Семаев С.Е. Современные высокотехнологичные методы молекулярно-генетической диагностики семейной гиперхолестеринемии. Материалы Российского национального конгресса кардиологов. 29 сентября - 1 октября 2022 года, Казань, 2022. С. 312.

63. Шахтшнейдер Е.В., Иваношук Д.Е., Колкер А.Б., Семаев С.Е., Орлов П.С., Тимощенко О.В. Технология молекулярно-генетической диагностики моногенных форм гиперхолестеринемии методами высокопроизводительного секвенирования. Атеросклероз. 2023. 19(3). 329-332. DOI 10.52727/2078-256X-2023-19-3-329-332.

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 – ПЦР с анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов
ПЦР-РТ – ПЦР в режиме реального времени
РНК – рибонуклеиновая кислота
СГХС – семейная гиперхолестеринемия
ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
ТГ – триглицериды

ФК – функциональный класс
ХС – холестерин
ХС-ЛНП – холестерин ЛНП
ХС-ЛВП – холестерин ЛВП
ABCA1 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства A1
ABCG1 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G1
ABCG5 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G5
ABCG8 – ген АТФ-связывающего кассетного транспортера подсемейства G8
ANGPTL3 – ген ангиопоэтин подобный 3
APOA1 – ген аполипопротеина A1
APOA4 – 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 Е
CETP – ген белка, переносящего эфиры холестерина
CLPS – ген колипазы
CYP7A1 – ген цитохром Р450 семейство 7 подсемейство А1
EL – эндотелиальная липаза
HL – печеночная липаза
HMGCR – ген 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА редуктазы
LCAT – лецитинхолинацилтрансфераза
LCAT – ген лецитинхолинацилтрансферазы
LDLR – ген рецептора ЛНП
LDLRAP1 – ген белка адаптера рецепторов липопротеинов низкой плотности
LIPA – ген липаза А, тип лизосомальной кислоты
LIPC – ген липазы С, печеночного типа
LIPG – ген липазы G, эндотелиального типа
LMF1 – ген фактора созревания липазы 1
LMNA – ген ламина А/С
LPA – ген липопротеина(а)
LPL – ген липопротеинлипазы
LRP1B – ген белка 1В подобного LDL рецептору
MTTP – ген микросомального белка переносчика триглицеридов
NPC1L1 – ген NPC1 подобного внутриклеточного транспортера ХС 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 1В
SREBPF2 – ген белка, связывающего стерол-регулирующий элемент 2
SCAP – белок, активирующий разделение SREBPs
STAP1 – ген члена семейства адаптеров для преобразования сигналов 1
WHO – Всемирная организация здравоохранения

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:

НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ
634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, 10
Ученому секретарю диссертационного совета 24.1.215.03
д-ру мед. наук Назаренко М.С.
e-mail: maria.nazarenko@medgenetics.ru