

Технология молекулярно-генетической диагностики моногенных форм гиперхолестеринемии методами высокопроизводительного секвенирования

Е.В. Шахтшнейдер^{1,2}, Д.Е. Иваношук^{1,2}, А.Б. Колкер³, С.С. Семаев^{1,2},
П.С. Орлов^{1,2}, О.В. Тимощенко²

¹ НИИ терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН», г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный технический университет, г. Новосибирск, Россия

Моногенные нарушения — патологии, которые вызваны изменениями только одного гена. Одним из наиболее распространенных (1:250) моногенных нарушений липидного обмена является семейная гиперхолестеринемия (СГХС) [1]. СГХС приводит к раннему развитию сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) атеросклеротического генеза [2–4]. Редкие патогенные варианты в гене *LDLR* определяются в 80–85 % случаев, когда выявлена молекулярно-генетическая причина развития СГХС, варианты в других генах определяются с частотой менее 5 % (*APOB*, *PCSK9*, *LDLRAP1*, *ABCG5*, *ABCG8* и др.) [5, 6]. У лиц с СГХС риск развития ССЗ в 2,5–10 раз выше по сравнению с контрольной группой [7, 8], но в случае диагностики и лечения СГХС в раннем возрасте риск значительно снижается ($\approx 80\%$) [7]. Активное выявление пациентов с СГХС и применение каскадного скрининга могут помочь обеспечить лечение до начала клинических проявлений ССЗ [9].

Редкие дислипидемии (менее 1:2000) представлены разнообразной группой наследственных нарушений обмена веществ, которые могут быть аутосомно-доминантными, кодоминантными или рецессивными [10]. Идентифицировано не менее 25 различных моногенных редких дислипидемий с различными биохимическими и клиническими признаками, ассоциированные с вариантами в 23 генах [11]. Эти заболевания представляют значительную проблему при диагностике, которая обычно основывается на анализе клинических фенотипов. Молекулярно-генетическое исследование позволяет поставить окончательный диагноз [10]. Самыми распространенными признаками редких дислипидемий являются крайние отклонения в значениях липидного профиля крови, особенно в молодом возрасте, и наличие семейного анамнеза заболевания [12]. Редкие дислипидемии характеризуются аномальными уровнями не только общего холестерина (ОХС) и холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛПНП), но и триглицеридов (ТГ), липопротеина (а), холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП).

Эти нарушения повышают риск развития атеросклеротических ССЗ. Кроме того, у пациентов могут наблюдаться другие клинические проявления, включая панкреатит, неалкогольную жировую болезнь печени и дефицит жирорастворимых витаминов [12]. К редким дислипидемиям относятся гомозиготная СГХС, синдром семейной хиломикронемии, обусловленный различными генетическими причинами, гипобета-липопротеинемия, гипоальфа-липопротеинемия, дисбета-липопротеинемия, церебротендинозный ксантоматоз и дефицит лизосомальной кислой липазы [13].

Для молекулярно-генетической диагностики моногенных форм ГХС методами высокопроизводительного секвенирования используют таргетное секвенирование, полноэкзомное или полногеномное секвенирование. Дополнительно в диагностике моногенных форм ГХС выполняется фрагментный анализ (для исключения крупных инсерций/делеций в генах) и/или прямое автоматическое секвенирование. Использование молекулярно-генетической диагностики позволяет подобрать медикаментозную терапию с учетом персонализированной генетической информации. Молекулярно-генетическая диагностика также эффективна для подтверждения наличия или отсутствия патогенных вариантов в генах у родственников пациентов. Объем генерируемых данных в медицинских исследованиях, применяющих методы секвенирования нового поколения, требует качественно новых подходов для их анализа с использованием методов машинного обучения и искусственного интеллекта [14–16].

Цель: молекулярно-генетическая диагностика моногенных форм ГХС с использованием методов высокопроизводительного секвенирования и машинного обучения на реальных клинических данных.

Методы. Группа пациентов с наследственными формами ГХС ($n = 134$) обследована в клинико-диагностическом отделении НИИТПМ — филиала ИЦиГ СО РАН. Исследование одобрено этическим комитетом НИИТПМ — филиала

ИЦИГ СО РАН № 68 от 04.06.2019. От каждого участника исследования получено информированное согласие.

Диагноз СГХС был поставлен с использованием клинических липидных критериев Dutch Lipid Clinic Network [17]. Пациентам проведено клиническое обследование, ультразвуковая диагностика, выполнен забор крови для биохимического и молекулярно-генетического исследования. Пробы крови для биохимических исследований забирали однократно из локтевой вены утром натощак через 12 ч после приема пищи. Уровень липидов (ОХС, ТГ, ХС ЛПНП, ХС ЛПВП) и глюкозы определяли энзиматическими методами на автоматическом биохимическом анализаторе KoneLab300i (Финляндия) с использованием реактивов Termo Fisher (Финляндия). Содержание ХС ЛПНП рассчитывали по формуле Фридвальда, при ХС ЛПНП более 4,5 ммоль/л использовали метод прямого определения ХС ЛПНП.

Для выделения ДНК из крови использовали метод фенол-хлороформной экстракции [18]. Качество извлеченной ДНК оценено с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Tec. Inc., США).

Выполнено таргетное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) авторской панели 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*, с использованием системы NimbleGen SeqCap Target Enrichment (Roche). Для определения структурных изменений (делеции, дубликации) промотора и экзонов гена *LDLR* выполнена мультиплексная лигазозависимая амплификация (MLPA) с использованием набора SALSA MLPA KIT P062 (MRCHolland, Нидерланды). Полногеномное секвенирование выполнено на платформе HiSeq 1500 (Illumina).

Автоматизированная обработка и аннотирование полученных данных секвенирования проводились на платформе NGS Wizard (genomenal.ru). Патогенность новых вариантов оценивалась в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии [19]. Анализ сетей белок-белковых взаимодействий проводился в STRING [20].

Группа пациентов с СГХС была использована для прямого обучения алгоритмов классификации (данные обучения и внутренний тест) [21].

Результаты. Методами высокопроизводительного секвенирования и MLPA определены «патогенные» и «вероятно патогенные» варианты у 40 % обследованных пробандов.

Варианты в гене *LDLR* (rs121908038, rs137853964, rs28942078, rs539080792, rs570942190, rs755757866, rs761954844, rs879254566, rs879254721, rs879254980, rs879255191, rs875989907, rs879254769, rs875989894) у пациентов с фенотипом СГХС были представлены в гетерозиготной форме. В двух случаях определены компаунд-гетерозиготы. У двух неродственных пациентов выявлены крупные делеции в гене *LDLR*.

У семи пробандов был определен вариант rs5742904 в гене *APOB* в гетерозиготной форме. У одного пациента с наличием ГХС и гипертриглицеридемии выявлен вариант rs118204077 в гене *LPL*. В одном случае диагностирован редкий вариант $\epsilon 1/\epsilon 4$ в гене *APOE* у пациента с ГХС и атеросклеротическими ССЗ в анамнезе.

После проведения таргетного высокопроизводительного секвенирования сформирована выборка с использованием алгоритма машинного обучения из пяти пробандов с тяжелой формой ГХС без патогенных вариантов в изученных генах для последующего проведения полногеномного секвенирования. Методом полногеномного секвенирования определены редкие варианты в генах *LRP1B*, фосфолипазы D1 (*PLD1*), белка, переносящего эфиры ХС (*CETP*).

Заключение. Использование высокопроизводительного секвенирования для диагностики моногенных форм ГХС оптимизирует доступ к своевременному, основанному на фактических данных, генетическому и геномному тестированию и персонализированной терапии заболевания.

Финансирование. Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 22-25-00743 и грантом Администрации Новосибирской области 2023 г.

Литература

1. Ezhov M.V., Bazhan S.S., Ershova A.I., Meshkov A.N., Sokolov A.A., Kukharchuk V.V., Gurevich V.S., Voevoda M.I., Sergienko I.V., Shakhshneider E.V., Pokrovsky S.N., Kononov G.A., Leontyeva I.V., Konstantinov V.O., Shcherbakova M.Yu., Zakharova I.N., Balakhonova T.V., Filippov A.E., Akhmedzhinov N.M., Aleksandrova O.Yu., Lipovetsky B.M. Clinical Guidelines for Familial Hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2019; 15 (1): 58–98. (In Russ.) [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 Г.А., Леонтьева И.В., Константинов В.О., Щербакова М.Ю., Захаров

- ва И.Н., Балахонова Т.В., Филиппов А.Е., Ахмеджанов Н.М., Александрова О.Ю., Липовецкий Б.М. Клинические рекомендации по семейной гиперхолестеринемии. *Атеросклероз*, 2019; 15 (1): 58–98.
2. Borén J., Chapman M.J., Krauss R.M., Packard C.J., Bentzon J.F., Binder C.J., Daemen M.J., Demer L.L., Hegele R.A., Nicholls S.J. et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease: Pathophysiological, genetic, and therapeutic insights: A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.*, 2020; 41: 2313–2330. doi: 10.1093/eurheartj/ehz962
3. Santos R.D., Gidding S.S., Hegele R.A., Cuchel M.A., Barter P.J., Watts G.F., Baum S.J., Catapano A.L., Chapman M.J., Defesche J.C. et al. International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: A consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2016, 4, 850–861. doi: 10.1016/S2213-8587(16)30041-9
4. Wiegman A., Gidding S.S., Watts G.F., Chapman M.J., Ginsberg H.N., Cuchel M., Ose L., Averna M., Boileau C., Borén J. et al. European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: Gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *Eur. Heart J.*, 2015; 36: 2425–2437. doi: 10.1093/eurheartj/ehv157
5. Nordestgaard B.G., Chapman M.J., Humphries S.E., Ginsberg H.N., Masana L., Descamps O.S., Wiklund O., Hegele R.A., Raal F.J., Defesche J.C. et al.; European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: Guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: Consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur. Heart J.*, 2013; 34: 3478–3490. doi: 10.1093/eurheartj/ehz273
6. Vasilyev V., Zakharova F., Bogoslovskaya T., Mandelstam M. Familial Hypercholesterolemia in Russia: Three Decades of Genetic Studies. *Front. Genet.*, 2020; 11: 550591. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.550591>
7. Gidding S.S., Champagne M.A., de Ferranti S.D., Defesche J., Ito M.K., Knowles J.W., McCrindle B., Raal F., Rader D., Santos R.D., Lopes-Virella M., Watts G.F., Wierzbicki A.S.; American Heart Association Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in Young Committee of Council on Cardiovascular Disease in Young, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Functional Genomics and Translational Biology, and Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health. The Agenda for Familial Hypercholesterolemia: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation.*, 2015 Dec 1; 132 (22): 2167–2192. doi: 10.1161/CIR.0000000000000297
8. Khera A.V., Won H.H., Peloso G.M., Lawson K.S., Bartz T.M., Deng X., van Leeuwen E.M., Natarajan P., Emdin C.A., Bick A.G., Morrison A.C., Brody J.A., Gupta N., Nomura A., Kessler T., Duga S., Bis J.C., van Duijn C.M., Cupples L.A., Psaty B., Rader D.J., Danesh J., Schunkert H., McPherson R., Farrall M., Watkins H., Lander E., Wilson J.G., Correa A., Boerwinkle E., Merlini P.A., Ardisson D., Saleheen D., Gabriel S., Kathiresan S. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2016 Jun 7; 67 (22): 2578–2589. doi: 10.1016/j.jacc.2016.03.520
9. Knowles J.W., Rader D.J., Khoury M.J. Cascade Screening for Familial Hypercholesterolemia and the Use of Genetic Testing. *JAMA*, 2017; 318 (4): 381–382. doi: 10.1001/jama.2017.8543
10. Hegele R.A., Borén J., Ginsberg H.N., Arca M., Averna M., Binder C.J. et al. Rare dyslipidaemias, from phenotype to genotype to management: A European atherosclerosis society task force consensus statement. *Lancet Diabetes Endocrinol.*, 2020; 8 (1), 50–67. doi: 10.1016/S2213-8587(19)30264-5
11. Hegele R.A., Ban M.R., Cao H., McIntyre A.D., Robinson J.F. and Wang J. Targeted next-generation sequencing in monogenic dyslipidemias. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2015; 26 (2): 103–113. doi: 10.1097/MOL.0000000000000163
12. Berberich A.J., Hegele R.A. A modern approach to dyslipidemia. *Endocr. Rev.*, 2022; 43 (4): 611–653. doi: 10.1210/endrev/bnab037
13. Sadiq F., Hegele R.A., Catapano A.L., Groselj U. Editorial: Rare dyslipidemias. *Front. Genet.*, 2023; 14: 1248435. doi: 10.3389/fgene.2023.1248435
14. Banda J.M., Sarraju A., Abbasi F., Parizo J., Pariani M., Ison H., Briskin E., Wand H., Dubois S., Jung K., Myers S.A., Rader D.J., Leader J.B., Murray M.F., Myers K.D., Wilemon K., Shah N.H., Knowles J.W. Finding missed cases of familial hypercholesterolemia in health systems using machine learning. *NPJ Digit. Med.*, 2019 Apr 11; 2: 23. doi: 10.1038/s41746-019-0101-5
15. Pina A., Helgadottir S., Mancina R.M., Pavanetto C., Pirazzi C., Montalcini T., Henriques R., Calabresi L., Wiklund O., Macedo M.P., Valenti L., Volpe G., Romeo S. Virtual genetic diagnosis for familial hypercholesterolemia powered by machine learning. *Eur. J. Prev. Cardiol.*, 2020 Oct; 27 (15): 1639–1646. doi: 10.1177/2047487319898951
16. Santos R.D. Advancing Prediction of Pathogenicity of Familial Hypercholesterolemia LDL Receptor Commonest Variants with Machine Learning Models. *JACC Basic Transl. Sci.*, 2021 Nov 22; 6 (11): 828–830. doi: 10.1016/j.jacbs.2021.10.008
17. WHO—Human genetics DoNDP. Familial hypercholesterolaemia—report of a second WHO consultation, Ed. Geneva: WHO, 1999 [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66346> (14.11.2022).
18. Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.*, 2006 Jun 1; 2006 (1): pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
19. Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Reh M.H.L.; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the

- Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.*, 2015 May; 17 (5): 405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30
20. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P. et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic. Acids. Res.*, 2019; 47: D607–D613.
 21. Колкер А.Б., Шахтштейнер Е.В., Иваношук Д.Е., Тимошенко О.В., Рагино Ю.И. Программа построения решающих правил для прогнозирования семейной гиперхолестеринемии на основе машинного обучения и секвенирования нового поколения (ПСГХС). Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2023660511, 22.05.2023. Заявка № 2023618558 от 02.05.2023.

DOI 10.52727/2078-256X-2023-19-3-332-334

Адипокино-цитокиновый профиль крови у мужчин с коронарным атеросклерозом на фоне избыточной массы тела

В.С. Шрамко, Е.В. Каштанова, Я.В. Полонская, Е.М. Стахнева, Ю.И. Рагино

НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФГБНУ ФИЦ ИЦиГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия

В настоящее время отмечается неуклонный рост распространенности избыточной массы тела и ожирения как у детей, так и у взрослых во всем мире, достигший на рубеже XXI в. масштабов эпидемии [1]. В России с 2012 по 2018 г. частота избыточного веса увеличилась на 7,8 %, составив 40,3 % [2]. Установлено, что каждое повышение индекса массы тела (ИМТ) на один пункт больше нормальных значений вызывает увеличение на 10 % риска развития атеросклероза и ишемической болезни сердца (ИБС). [3]. По данным Global Burden of Disease group, повышенные значения ИМТ стали причиной 4 млн смертей в 2015 г., причем 2/3 этого числа приходилось на сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) [1].

Жировая ткань играет важнейшую роль как в локальных (ауто- и паракринная регуляция), так и в системных функциях организма. Избыточное накопление жира приводит к нарушению секреции адипоцитокинов и системной дисрегуляции метаболизма [4]. В свою очередь, дисбаланс адипокино-цитокинового профиля играет важную роль в развитии ССЗ. Исследования по изучению влияния адипоцитокинов на эти процессы происходят очень интенсивно, однако многие аспекты до сих пор остаются не выясненными [5].

Цель: изучение адипокино-цитокинового профиля, а также ассоциации его компонентов с нестабильными атеросклеротическими бляшками у мужчин с коронарным атеросклерозом на фоне избыточной массы тела.

Материал и методы. Дизайн исследования – одномоментное обсервационное. Исследование проводилось в рамках Программы совместных научных исследований НИИТПМ – филиа-

ла ИЦиГ СО РАН и ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. На этапе отбора пациентов в исследование были включены 140 мужчин в возрасте 40–77 лет ($60,74 \pm 7,16$ года) с коронароангиографически верифицированным атеросклерозом коронарных артерий, без острого коронарного синдрома, со стабильной стенокардией напряжения II–III ФК, госпитализированных в клинику ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России на операцию коронарного шунтирования (КШ) с 2011 по 2021 г.

В ходе операции КШ у 116 пациентов (возраст $51,91 \pm 11,03$ года) строго по интраоперационным показаниям проводилась эндартерэктомия из коронарной/-ых артерии/-ий. Дальнейшие исследования гистологического материала проводили в патоморфологической лаборатории ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина» Минздрава России. Гистологический анализ фрагментов комплекса «интима-медиа» коронарных артерий изучали на бинокулярном микроскопе Axiostar Plus после макроскопического описания и стандартной окраски гематоксилин-эозином по Ван Гизону. Исследование фрагментов интима-медиа выявило наличие стабильных и нестабильных атеросклеротических бляшек. Нестабильную бляшку дифференцировали согласно следующим критериям: толщина фиброзной покрышки менее 65 мкм, инфильтрация макрофагами и Т-лимфоцитами (более 25 клеток в поле зрения 0,3 мм), крупное липидное ядро (более 40 %) [6].

Из пациентов с коронарным атеросклерозом были отобраны 36 мужчин с избыточной массой тела ($\text{ИМТ} \geq 25$ и $< 30 \text{ кг/м}^2$) [7]. Отобранные в исследование пациенты были разделены на две