

Иванова Анастасия Андреевна

КОМПЛЕКСНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ
ВНЕЗАПНОЙ СЕРДЕЧНОЙ СМЕРТИ

3.1.20. Кардиология

1.5.7. Генетика (медицинские науки)

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины - филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук»

Научный консультант:

доктор медицинский наук, профессор

Максимов Владимир Николаевич

Официальные оппоненты:

Кашгалап Василий Васильевич, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», заведующий отделом клинической кардиологии

Мешков Алексей Николаевич, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель лаборатории молекулярной генетики

Лифшиц Галина Израилевна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук», заведующая лабораторией персонализированной медицины

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования "Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится « » _____ 2023 года в ____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.239.02 созданного на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» по адресу: 630089, г. Новосибирск, улица Бориса Богаткова, 175/1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте НИИТПМ - филиал ИЦиГ СО РАН (630089, г. Новосибирск, улица Бориса Богаткова, 175/1, <http://www.iimed.ru>).

Автореферат разослан « » _____ 2023 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

доктор медицинских наук

С.В. Мустафина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Внезапная сердечная смерть, в том числе генетика внезапной сердечной смерти, являются важной нерешенной проблемой современной клинической кардиологии. Россия продолжает оставаться в списке стран, лидирующих по смертности населения от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) (European detailed mortality database (2014), World Health Organization). На долю ССЗ приходится около половины в структуре причин смертности населения в регионах Российской Федерации, в том числе и в Новосибирской области (Федеральная служба государственной статистики, Новосибирскстат). Считается, что 25 % лиц, умерших от ССЗ умирают внезапной сердечной смертью. В молодом возрасте причиной развития внезапной сердечной смерти чаще всего становятся нарушения ритма на фоне структурной патологии сердца, дисфункции ионных каналов, органических заболеваний сердца (кардиомиопатии, пороки сердца). В среднем и пожилом возрасте на первый план выходит ишемическая болезнь сердца (ИБС) и другие дегенеративные ССЗ. При этом в молодом возрасте зачастую причину внезапной сердечной смерти не удастся определить и при проведении качественного патологоанатомического исследования. Примерно в половине случаев внезапная сердечная смерть развивается у лиц без диагностированного при жизни ССЗ (Ревишвили А.Ш. и др., 2017). Поэтому важным является создание системы эффективной оценки риска внезапной сердечной смерти у лиц как с известной, так и с неизвестной сердечно-сосудистой патологией. Существующие системы оценки риска внезапной сердечной смерти направлены на лиц с известными ССЗ и состояниями (Шляхто Е.В. и др., 2013). Внезапная сердечная смерть - многофакторная (мультифакториальная) нозология, для развития которой в большинстве случаев необходимо сочетание многих факторов (внешних и внутренних). К внутренним немодифицируемым факторам риска внезапной сердечной смерти относятся и генетические факторы, включающие в себя в первую очередь изменения структуры ДНК в виде мутаций и полиморфизмов генов, полиморфизмов, локализованных в межгенных пространствах. Кроме того, к генетическим факторам также можно отнести эпигенетические модификации, которые не изменяют последовательность ДНК, но меняют экспрессию генов (метилирование генов, ацетилирование гистонов и т.д.). В мире активно изучаются молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти, которые при результативном поиске наравне с клиническими, биохимическими маркерами могут быть использованы при разработке

стратегии диагностики предрасположенности к внезапной сердечной смерти и проведения профилактики внезапной сердечной смерти у лиц, как с известной, так и неизвестной сердечно-сосудистой патологией.

Степень разработанности темы исследования

Исследования молекулярно-генетических основ внезапной сердечной смерти ведутся достаточно давно. Долгое время основной задачей исследователей был поиск генов-кандидатов внезапной сердечной смерти, «рисковых» полиморфизмов генов в проектах дизайна «случай-контроль» с использованием группы лиц умерших внезапной сердечной смертью и контрольной группы живых лиц или лиц, умерших не вследствие внезапной сердечной смерти. В таких исследованиях используются рутинные методы молекулярно-генетического анализа - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени и полимеразная цепная реакция с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. В первую очередь проверяются на предмет ассоциации с внезапной сердечной смертью молекулярно-генетические маркеры заболеваний, лежащих в основе внезапной сердечной смерти (молекулярно-генетические маркеры ИБС, нарушений ритма, кардиомиопатий) и молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти, найденные ассоциированными с ней по данным зарубежных исследований. На сегодняшний день исследования такого рода прошли свой пик популярности, однако все еще сохраняются одиночные исследования «случай-контроль» для внезапной сердечной смерти. На данный момент согласно данным базы dbGene 62 гена ассоциированы с внезапной сердечной смертью (Gao B.F. et al., 2018). По данным базы ClinVar 19788 вариантов имеют отношение к внезапной сердечной смерти, из которых 1148 возможно патогенные, 1429 патогенные, подавляющее число вариантов - однонуклеотидные замены (более 18000) (dbClinVar). При этом число генов, полиморфизмов и мутаций генов, ассоциированных с внезапной сердечной смертью, постоянно увеличивается за счет вновь найденных.

С развитием биоинформатики и современных методов секвенирования на первый план выходят исследования внезапной сердечной смерти с помощью современного полногеномного, полноэкзомного секвенирования, секвенирования клинического экзома, панелей генов. Секвенирование следующего поколения обеспечивает быстрый и экономичный подход к генетическому скринингу большого числа генов, представляя собой амбициозную стратегию по сравнению с секвенированием по Сэнгеру, позволяя найти новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти, полиморфизмы и мутации, связь которых с внезапной сердечной смертью, ранее даже и не предполагалась. Однако использование результатов секвенирования следующего поколения в клинической практике остается проблемой из-за большого количества генетической информации, которую

необходимо интерпретировать для оценки ее клинической значимости (Allegue C. et al., 2015).

Исследования с помощью секвенирования по Сэнгеру (прямое автоматическое секвенирование) также остаются в арсенале исследователей, этот метод нашел свое применение для исследования причин внезапной сердечной смерти в отдельных семейных случаях внезапной сердечной смерти, для подтверждения мутаций, найденных с помощью секвенирования следующего поколения (Yu W. et al., 2021).

С развитием генетических знаний появляются редкие эпигенетические исследования внезапной сердечной смерти: проведено сравнительное исследование метилирования ДНК при внезапной необъясненной смерти и внезапной смерти при эпилепсии, других исследований метилирования ДНК при внезапной сердечной смерти найдено не было (Christiansen S.N. et al., 2021).

Однако молекулярно-генетические маркеры, идентифицированные в зарубежных исследованиях, не могут быть слепо экстраполированы на российскую популяцию, поскольку существуют расовые, половые, возрастные, этнические особенности распределения генетического материала, и молекулярно-генетические маркеры нозологии в одной стране могут не оказаться таковыми для популяции другой страны, региона. Поэтому российские исследования являются нужными и важными для понимания молекулярно-генетических основ внезапной сердечной смерти.

Цели

Цель - изучить ассоциации внезапной сердечной смерти с рядом молекулярно-генетических и эпигенетических маркёров.

Задачи

1. Провести анализ ассоциации внезапной сердечной смерти с генотипами и аллелями ряда однонуклеотидных полиморфизмов генов, выявленных при проведении полногеномного аллелотипирования как возможные новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти, в выборке умерших внезапной сердечной смертью в Октябрьском районе г. Новосибирска. В случае ассоциации внезапной сердечной смерти с полиморфизмом изучить его ассоциацию с некоторыми антропометрическими, биохимическими показателями в контрольной группе и некоторыми параметрами судебно-медицинского исследования в группе внезапной сердечной смерти.
2. У лиц умерших внезапной сердечной смертью провести поиск десяти мутаций генов, которые были описаны в качестве патогенных и вероятно патогенных по результатам полноэкзомного секвенирования внезапной сердечной смерти в зарубежных исследованиях.

3. У мужчин молодого возраста умерших внезапной сердечной смертью оценить результативность молекулярной аутопсии методом экзомного секвенирования при поиске патогенных вариантов генов.
4. Провести анализ ассоциации внезапной сердечной смерти с генотипами и аллелями ряда однонуклеотидных полиморфизмов генов, выявленных при проведении экзомного секвенирования как вероятные новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти. В случае ассоциации внезапной сердечной смерти с полиморфизмом изучить его ассоциацию с некоторыми антропометрическими, биохимическими показателями в контрольной группе и некоторыми параметрами судебно-медицинского исследования в группе внезапной сердечной смерти.
5. Провести исследование ассоциации внезапной сердечной смерти со статусом метилирования CpG-островков промоторов или экзонов нескольких генов, метилирование которых ассоциировано с ишемической болезнью сердца по данным международных исследований.

Научная новизна

Впервые найдена ассоциация внезапной сердечной смерти с однонуклеотидными полиморфизмами rs34554140, rs6670279, rs12904699 гена *OR4F6*, rs12170546 гена *PARVB*, rs6582147, rs2136810 гена *ARAP2*, rs16994849 гена *PLCB1*, rs17797829, rs35089892 гена *CAMK2B*, rs6762529 гена *NAALADL2*, rs10010305, rs61999948, rs34643859 гена *KCNS1* в выборке умерших внезапной сердечной смертью в Октябрьском районе г. Новосибирска. Получены новые данные по ассоциации с признаками атеросклероза генотипа TT rs61999948; с индексом атерогенности - генотипа CT rs6762529 гена *NAALADL2*; с толщиной миокарда правого желудочка и частотой сердечных сокращений - генотипа CC rs34643859 гена *KCNS1*.

У внезапно умерших жителей г. Новосибирска проведен поиск десяти мутаций, которые были описаны в качестве патогенных и вероятно патогенных в случаях внезапной сердечной смерти в зарубежных исследованиях: в выборке умерших внезапной сердечной смертью в Октябрьском районе г. Новосибирска найдены носители мутации 9928_9929insE гена *TTN* в группе внезапной сердечной смерти (4,1 %) и контрольной группе (3,8 %), но по результатам статистического анализа мутация 9928_9929insE гена *TTN* оказалась не ассоциированной с внезапной сердечной смертью; не найдено носителей мутаций D4301N и I22160T гена *TTN*, A1744S и R249Q гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, Y1495X гена *SCN5A* в исследуемой выборке.

Впервые в России проведено экзомное секвенирование группы мужчин (37 человек) с внезапной сердечной смертью до 45 лет: в 18 случаях обнаружено 34 варианта, вероятно

связанных с фенотипом внезапной сердечной смерти. Идентифицировано шесть новых редких вариантов нуклеотидной последовательности генов *TGFB3*, *ABCC9*, *APOB*, *CASQ2*, *RYR2*, *ANKRD1*.

Впервые проведена оценка ассоциации внезапной сердечной смерти со статусом метилирования CpG-островков расположенных в промоторе или экзонах генов *ABCA1*, *HMGCR*, *F2RL3*, *CDKN2A*. Показано, что внезапная сердечная смерть ассоциирована с метилированием промотора гена *ABCA1*.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты настоящей работы позволили получить сведения об ассоциации с внезапной сердечной смертью ряда полиморфизмов, мутаций генов, статуса метилирования некоторых генов в популяции г. Новосибирска. Накопление такого рода информации является необходимым этапом на пути разработки стратегии первичной профилактики внезапной сердечной смерти, в том числе у лиц с неизвестной ранее кардиальной патологией. Полученные результаты могут быть полезны при планировании будущих исследований внезапной сердечной смерти на европеоидной популяции России.

Результаты исследования показали, что молекулярная аутопсия методом экзомного секвенирования является высокоэффективным подходом для генетического анализа редких клинических фенотипов, к которым относится внезапная сердечная смерть, что соответствует инструкциям по организации и проведению экспертных исследований в Бюро судебно-медицинской экспертизы (приказ Минздрава РФ от 24.01.2003 № 161), в которых рекомендовано взятие образцов для молекулярного исследования, а в случае подозрения на генетически-детерминированное нарушения ритма сердца как причины внезапной сердечной смерти проведение посмертной молекулярной диагностики является обязательным, однако до сих пор это редко проводится.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование включает в себя 5 этапов, позволяющих комплексно оценить молекулярно-генетические аспекты внезапной сердечной смерти.

На первом этапе проведено исследование ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных по результатам полногеномного аллелотипирования, как возможных новых молекулярно-генетических маркеров внезапной сердечной смерти. Дизайн исследования «случай-контроль», молекулярно-генетический анализ проведен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

Второй этап состоял из поиска в группе внезапной сердечной смерти мутаций генов, найденных по результатам полноэкзомного секвенирования в зарубежных исследованиях в

отдельных случаях внезапной сердечной смерти. Дизайн исследования «случай-контроль», молекулярно-генетический анализ проведен с помощью ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

На третьем этапе проведено экзомное секвенирование, осуществлен анализ полученных данных, найденные вероятно причинные мутации были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру.

Четвертый этап включал исследование ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных при анализе результатов экзомного секвенирования, как вероятных молекулярно-генетических маркеров внезапной сердечной смерти. Дизайн исследования «случай-контроль», молекулярно-генетический анализ проведен с помощью ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

На пятом этапе осуществлен анализ ассоциации с внезапной сердечной смертью метилирования CpG-островков отдельных генов, расположенных в промоторе или экзонах гена. Дизайн исследования «случай-контроль», молекулярно-генетический анализ проведен с помощью метилспецифической ПЦР.

В исследование включена группа лиц умерших внезапной сердечной смертью, внезапной несердечной смертью и контрольная группа. В работе использованы специальные методы исследования: в группах лиц, умерших внезапной несердечной смертью и внезапной сердечной смертью - метод судебно-медицинского исследования по стандартному протоколу; в контрольной группе - метод опроса, анкетирования, методы клинического (антропометрический метод, исследование артериального давления, пульса) и лабораторного исследований, современные методы молекулярно-генетического анализа. При обработке полученных результатов использовался метод статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ассоциированные с внезапной сердечной смертью однонуклеотидные полиморфизмы rs34554140, rs6670279 гена *NAALADL2*, rs12904699 гена *OR4F6*, rs12170546 гена *PARVB*, rs6582147, rs2136810 гена *ARAP2*, rs16994849 гена *PLCB1*, rs17797829, rs35089892 гена *CAMK2B*, rs6762529 гена *NAALADL2*, rs10010305, rs61999948, rs34643859 гена *KCNS1* являются новыми молекулярно-генетическими маркерами внезапной сердечной смерти. С повышенным риском внезапной сердечной смерти ассоциированы комбинации генотипов риска полиморфизмов rs10010305 и rs17797829, rs34554140 и rs6670279, rs2136810 и rs6582147. С частотой сердечных сокращений и толщиной миокарда правого желудочка ассоциирован однонуклеотидный полиморфизм rs34643859 гена *KCNS1*, с индексом атерогенности - rs6762529 гена *NAALADL2*, с признаками атеросклероза - rs61999948.

2. Известные в мировой литературе патогенные и вероятно патогенные для внезапной сердечной смерти мутации (D4301N и I22160T гена *TTN*, R249Q и A1744S гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, Y1495X гена *SCN5A*) не найдены у умерших внезапной сердечной смертью в г. Новосибирске, мутация 9928_9929insE гена *TTN* не ассоциирована с внезапной сердечной смертью.

3. У мужчин в возрасте до 45 лет умерших внезапной сердечной смертью в 48,7 % случаев обнаружены вероятно причинные варианты в генах-кандидатах внезапной сердечной смерти по данным экзомного секвенирования.

4. С внезапной сердечной смертью ассоциировано метилирование промотора гена *ABCA1*.

Степень достоверности и апробация результатов

В исследование однонуклеотидных полиморфизмов и мутаций генов включена достаточно большая выборка лиц умерших внезапной сердечной смертью (441 человек) и сопоставимая контрольная группа (432 человека), для исследования статуса метилирования генов использованы сопоставимые группы внезапной сердечной и несердечной смерти (по 150 человек в каждой группе). При формировании группы внезапной сердечной смерти были использованы критерии внезапной сердечной смерти Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) и Европейского Общества Кардиологов (European Society of Cardiology). Патологоанатомическое исследование умерших проводилось по стандартному протоколу судебно-медицинскими экспертами ГБУЗ НСО "НОКБСМЭ". Контрольная группа сформирована из баз данных международных проектов HAPIEE и MONICA. Методики обследования, использованные в данных проектах, были стандартизованы для всех участников. В ходе проведения молекулярно-генетической части работы использовались современные методы исследования. Полученные результаты обработаны с использованием общепринятых методов статистического анализа.

Основные результаты исследования представлены в виде устных докладов (Национальный конгресс терапевтов, Москва, 2017 год; Фундаментальные исследования в эндокринологии: современная стратегия развития и технологии персонализированной медицины, Новосибирск, 2020 год; IX съезд кардиологов Сибирского федерального округа, Новосибирск, 2021 год; Национальный конгресс терапевтов, Москва, 2021 год) и постерных докладов (The international symposium systems biology and biomedicine (SBIOMED-2016), Новосибирск, 2016 год; The European Human Genetics Conference 2017, Копенгаген, Дания, 2017 год; Российский национальный конгресс кардиологов, Санкт-Петербург, 2017 год; IX Съезд российского общества медицинских генетиков, Москва, 2021 год).

Диссертационная работа выполнена в рамках грантов РФФИ № 16-34-00147, № 17-29-06026, № 20-115-50004, гранта РФФИ и Правительства Новосибирской области № 19-415-543001, стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики, грантов Правительства Новосибирской области.

Публикации результатов исследования

По результатам работы опубликовано 21 статья в журналах, рекомендованных перечнем ВАК РФ (из них 9 индексируются в базах данных Scopus/Web of Science), 28 тезисов докладов.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 288 страницах машинописного текста, иллюстрирована 32 таблицами и 34 рисунками. Работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты и обсуждения), содержит заключение, выводы и указатель литературы, включающий 373 ссылки, приложение, состоящее из 5 таблиц.

Личный вклад автора

Автор принимал участие в выделении ДНК методом фенолхлороформной экстракции из ткани миокарда в рамках формирования банка ДНК внезапной смерти, участвовал в формировании групп, включенных в исследование. Автор самостоятельно осуществлял отбор полиморфизмов, мутаций для генотипирования и генов для эпигенетического анализа. Автором самостоятельно разработаны методики полимеразной цепной реакции для каждого полиморфизма, мутации, включенной в исследование. Автор совместно с сотрудниками лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний проводил генотипирование исследуемых групп по выбранным полиморфизмам и мутациям, оценку статуса метилирования исследуемых генов. Автор самостоятельно осуществлял статистический анализ полученных данных. Автор участвовал в анализе данных экзомного секвенирования. Совместно с соавторами создана и зарегистрирована база данных. В соавторстве написаны и опубликованы печатные работы в журналах, рекомендованных Перечнем ВАК, в которых отражены научные результаты по теме диссертации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании использован архивный анонимный банк ДНК лиц умерших внезапной смертью и банки ДНК международных исследований MONICA (Multinational MONItoring of trends and determinants in CArdiovascular disease) и HAPIEE (Health, Alcohol and Psychosocial

factors In Eastern Europe). ДНК выделена методом фенол-хлороформной экстракции из ткани миокарда лиц, включенных в банк ДНК внезапной смерти и венозной крови лиц из банков ДНК исследований MONICA и HAPIEE.

В банк ДНК внезапной смерти включены внезапно умершие вне лечебных учреждений жители Октябрьского района города Новосибирска, судебно-медицинское исследование которых проводилось по стандартному протоколу экспертами ГБУЗ НСО "Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы". Банк ДНК внезапной смерти формировался сплошным включением случаев внезапной смерти в несколько этапов (1999-2005 годы, 2012 год, 2018-2019 годы). Из банка ДНК внезапной смерти сформирована группа внезапной сердечной смерти и группа лиц умерших внезапной несердечной смертью. Группа внезапной сердечной смерти ($n = 441$, средний возраст умерших – $51,9 \pm 10,2$ года, доля мужчин – 72,1 %, женщин – 27,9 %) сформирована с использованием критериев внезапной сердечной смерти ВОЗ и Европейского Общества Кардиологов (основные патологоанатомические диагнозы: острое нарушение кровообращения, острая коронарная недостаточность, острая сердечно-сосудистая недостаточность, внезапная сердечная смерть). Из группы исключены лица с патологоанатомическими диагнозами – инфаркт миокарда, дилатационная (ДКМП) или гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), лица, находящиеся в состоянии наркотического опьянения, тяжелого или смертельного отравления алкоголем. Для группы внезапной сердечной смерти отсутствуют данные истории жизни и болезни. Группа внезапной несердечной смерти (150 мужчин, средний возраст умерших – $42,6 \pm 1,2$ года) сформирована из лиц, умершие внезапно, но не вследствие сердечно-сосудистой патологии. Группа внезапной несердечной смерти включена в исследование метилирования генов в качестве контрольной группы. В качестве группы случая в исследовании метилирования генов использована подгруппа мужчин из группы внезапной сердечной смерти ($n = 150$, средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года). Группы статистически значимо не отличаются по возрасту. Подбор контрольной группы из банка ДНК лиц умерших внезапно и использование ДНК выделенной из ткани миокарда, как в группе внезапной сердечной смерти, так и в группе контроля продиктовано доказанной тканеспецифичностью метилирования ДНК. Для проведения экзомного секвенирования из группы внезапной сердечной смерти отобрано 37 молодых мужчин до 45 лет (средний возраст умерших – $32,4 \pm 6,4$ года, минимальный возраст 20 лет).

Из банков ДНК исследований MONICA и HAPIEE сформирована основная группа контроля ($n = 432$, средний возраст – $53,2 \pm 8,9$ года, мужчины – 69,8 %, женщины – 30,2). В

контрольную группу включены живые (на момент проведения исследований MONICA и НАРИЕЕ) жители Октябрьского района города Новосибирска соответствующего пола и возраста (методика подбора примерно 1:1 к группе внезапной сердечной смерти. Группы контроля и внезапной сердечной смерти статистически значимо не отличаются друг от друга по полу и возрасту.

Этапы исследовательской работы.

Этап 1. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных по результатам полногеномного аллелотипирования. Дизайн исследования «случай-контроль»: группа внезапной сердечной смерти ($n = 441$, средний возраст умерших - $51,9 \pm 10,2$ года, доля мужчин - 72,1%, женщин - 27,9%) и основная контрольная группа ($n = 432$, средний возраст - $53,2 \pm 8,9$ года, мужчины - 69,8 %, женщины - 30,2). В отношении ассоциации с внезапной сердечной смертью проверено 22 однонуклеотидных полиморфизма (ОНП) (rs34554140, rs6670279, rs6874185, rs10867772, rs4700290, rs75555045 гена *SCG5*, rs12904699 гена *OR4F6*, rs7164665, rs71461059, rs6762529 гена *NAALADL2*, rs62116755 гена *GACAT3*, rs12170546 гена *PARVB*, rs16994849 гена *PLCB1*, rs78143315 гена *PDCD6IP*, rs6582147, rs10010305, rs2136810 гена *ARAP2*, rs17797829, rs13246896 гена *HDAC9*, rs35089892 гена *CAMK2B*, rs7172856, rs61999948). Генотипирование выполнено методом ПЦР с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР - ПДРФ).

Этап 2. Исследование мутаций, выявленных методом полноэкзомного секвенирования в зарубежных исследованиях. Дизайн исследования «случай-контроль»: группа внезапной сердечной смерти ($n = 441$, средний возраст умерших - $51,9 \pm 10,2$ года, доля мужчин - 72,1%, женщин - 27,9%) и основная контрольная группа ($n = 432$, средний возраст - $53,2 \pm 8,9$ года, мужчины - 69,8 %, женщины - 30,2). Проведен поиск 10 мутаций в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе (D4301N, 9928_9929insE и I22160T гена *TTN*, A1744S и R249Q гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, Y1495X гена *SCN5A*). Генотипирование выполнено методом ПЦР - ПДРФ.

Этап 3. Экзомное секвенирование ДНК 37 молодых мужчин из группы внезапной сердечной смерти умерших внезапной сердечной смертью в возрасте до 45 лет. Экзомный анализ выполнен на платформе Illumina (Illumina, Calif., USA). Для приготовления библиотек использован набор SureSelect Focused Exome (Agilent, США) (4800 генов, оптимизирован для выявления вариантов, связанных с заболеваниями). Поиск функционально-значимых замен проводился в 205 генах, ассоциированных с внезапной сердечной смертью, синдромами нарушения ритма сердца, кардиомиопатиями. Для некоторых из выявленных вариантов (с

небольшой глубиной прочтения) было проведено подтверждающее прямое автоматическое секвенирование по Сэнгеру.

Этап 4. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных при анализе результатов экзомного секвенирования. Дизайн исследования «случай-контроль»: группа внезапной сердечной смерти ($n = 441$, средний возраст умерших - $51,9 \pm 10,2$ года, доля мужчин - 72,1%, женщин - 27,9%) и основная контрольная группа ($n = 432$, средний возраст - $53,2 \pm 8,9$ года, мужчины - 69,8 %, женщины - 30,2). В исследование включено 7 ОНП (rs34643859 гена *KCNS1*, rs12804550 гена *SCN4B*, rs4514993 гена *SCN11A*, rs1008832 гена *CACNA1C*, rs4027402 гена *SYNE2*, rs2340917 гена *TMEM43*, rs58225473 гена *CACNB2*), частота редкого аллеля которых полученная по результатам экзомного секвенирования в группе внезапной сердечной смерти значительно отличается от популяционной частоты для европеоидной расы по данным базы gnomAD. Генотипирование выполнено методом ПЦР - ПДФ.

Этап 5. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью метилирования отдельных генов. Дизайн исследования «случай-контроль»: подгруппа мужчин из группы внезапной сердечной смерти ($n = 150$, средний возраст $46,7 \pm 9,2$ года) и группа внезапной несердечной смерти (150 мужчин, средний возраст умерших - $42,6 \pm 1,2$ года). Оценен статус метилирования CpG-островков расположенных в промоторе или экзонах генов *ABCA1*, *HMGCR*, *F2RL3*, *CDKN2A*. Исследование выполнено методом метил-специфической ПЦР на бисульфит-конвертированной ДНК.

Этап 1, 2, 4, 5. Полученные результаты статистически обработаны с помощью пакета программ SPSS 16.0. Сравнение групп по частотам генотипов и аллелей выполнялось с помощью таблиц сопряжённости с использованием критерия хи-квадрат по Пирсону. В случае четырёхпольных таблиц применяли точный двусторонний критерий Фишера с поправкой Йетса на непрерывность. Относительный риск внезапной сердечной смерти по конкретному аллелю или генотипу вычисляли как отношение шансов с использованием точного двухстороннего критерия Фишера и критерия хи-квадрат по Пирсону. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

В случае ассоциации ОНП с внезапной сердечной смертью (этапы 1, 4) с целью оценки возможного патогенетического механизма, посредством которого полиморфизм вносит свой вклад в развитие феномена внезапной сердечной смерти, в контрольной группе изучена ассоциация ОНП с данными клинического, антропометрического, клинико-лабораторного исследований, в группе внезапной сердечной смерти - с данными судебно-медицинского исследования. Нормальность распределения параметров судебно-медицинского, клинического, антропометрического, лабораторных исследований

оценивалась с помощью теста Колмогорова-Смирнова. При нормальном распределении расчеты проводились с использованием теста ANOVA, Левена на гомогенность дисперсий, Дункана. В случае отклонения от нормального распределения использован тест Крускала-Уоллиса и тест Манна-Уитни. В случае номинальной и порядковой шкалы данных использованы таблицы сопряженности и тест хи-квадрат по Пирсону. В качестве уровня значимости использован $p < 0,05$.

Исследование выполнено с соблюдением этических принципов и с разрешения локального этического комитета НИИТПМ - филиала ИЦиГ СО РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных по результатам полногеномного аллелотипирования

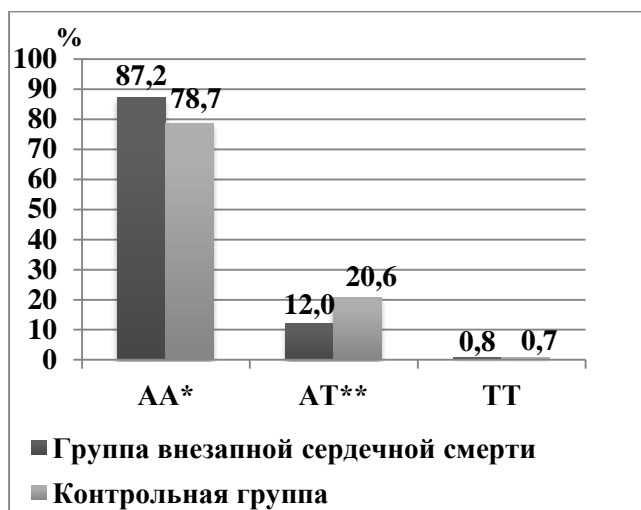
В ходе проведения полногеномного аллелотипирования получен список ОНП, которые с высокой вероятностью могут быть новыми молекулярно-генетическими маркерами внезапной сердечной смерти. Выявленные таким способом ОНП требуют обязательной проверки в исследовании дизайна случай-контроль с применением рутинных молекулярно-генетических методик для подтверждения их ассоциации с внезапной сердечной смертью, поскольку существует вероятность выявления в ходе полногеномных ассоциативных исследований ложноположительных молекулярно-генетических маркеров. В верифицирующее исследование включено 22 ОНП. Согласно доступной научной литературе изучаемые ОНП не были включены в какие-либо российские или зарубежные исследования.

В контрольной группе наблюдаемые частоты генотипов изучаемых ОНП соответствуют ожидаемым частотам в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга, кроме однонуклеотидного полиморфизма rs17797829.

Не обнаружено статистически значимых различий по частотам генотипов и аллелей rs6874185, rs10867772, rs4700290, rs75555045, rs7164665, rs71461059, rs62116755, rs78143315, rs13246896, rs7172856 между группой внезапной сердечной смерти и контрольной группой ($p > 0,05$), в том числе при разделении групп по полу и возрасту.

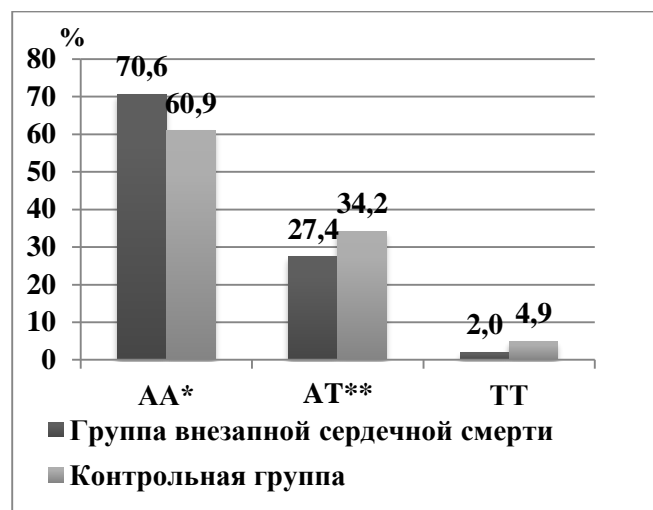
Доля носителей генотипа AA rs34554140 в группе внезапной сердечной смерти (87,2 %) больше по сравнению с контрольной группой (78,7 %) (AA vs AT + TT: ОШ = 1,85, 95 % ДИ 1,26–2,71, $p = 0,002$); доля носителей генотипа AT в группе внезапной сердечной смерти (12,0 %) значимо меньше по сравнению с контрольной группой (20,6 %) (AT vs AA + TT: ОШ = 0,53, 95 % ДИ 0,36–0,78, $p = 0,001$) (рисунок 1).

Доля носителей генотипа AA rs6670279 больше в группе внезапной сердечной смерти (70,6 %) по сравнению с контрольной группой (60,9 %) (AA vs AT + TT: ОШ = 1,54, 95 % ДИ 1,15–2,06, $p = 0,005$); доля носителей генотипа AT в группе внезапной сердечной смерти (27,4 %) значительно меньше по сравнению с контрольной группой (34,2 %) (AT vs AA + TT: ОШ = 0,73, 95 % ДИ 0,54–0,98, $p = 0,047$) (рисунок 2).



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 1 – Частоты генотипов rs34554140 в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе

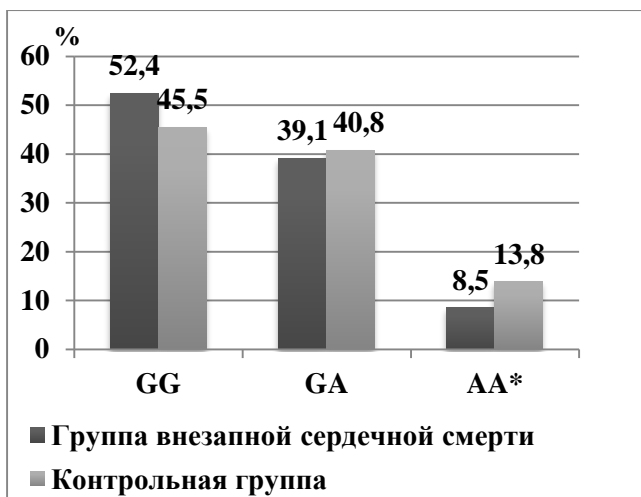


Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 2 – Частоты генотипов rs6670279 в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе

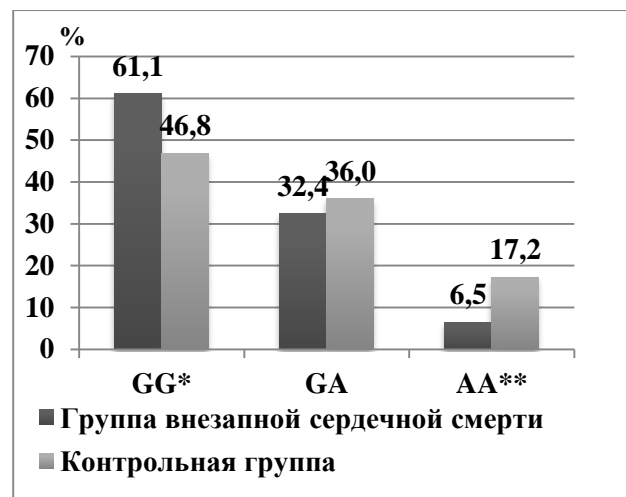
Доля генотипа AA rs12904699 в группе внезапной сердечной смерти меньше (8,5 %), чем в контрольной группе (13,8 %) (AA vs GG + GA: ОШ = 0,57, 95 % ДИ 0,36–0,89, $p = 0,014$) (рисунок 3). У женщин умерших внезапной сердечной смертью частота генотипа GG больше (61,1 %) по сравнению с контрольной группой того же пола (46,8 %) (GG vs GA + AA: ОШ = 1,78, 95 % ДИ 1,04–3,05, $p = 0,04$) (рисунок 4).

В группе старше 50 лет доля носителей генотипа CT rs6762529 в группе внезапной сердечной смерти меньше (37,8 %) по сравнению с контрольной группой (47,1 %) (CT vs TT + CC: ОШ = 0,69, 95 % ДИ 0,48–0,97, $p = 0,035$) (рисунок 5). У носителей генотипа CT индекс атерогенности ниже по сравнению с носителями генотипов CC и TT ($p = 0,006$) (таблица 1). Выявленная ассоциация индекса атерогенности с генотипом полиморфизма rs6762529 сохраняется и в группе старше 50 лет ($p = 0,016$). Возможно, вклад rs6762529 в развитие внезапной сердечной смерти обусловлен изменениями липидного обмена.



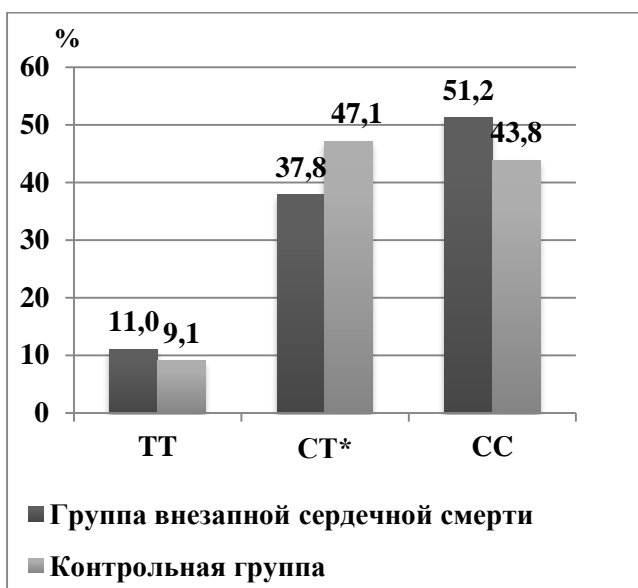
Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 3 – Частоты генотипов rs12904699 в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 4 – Частоты генотипов rs12904699 в группе женщин



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 5 – Частоты генотипов rs6762529 в группе старше 50 лет

Таблица 1 – Индекс атерогенности в контрольной группе в зависимости от генотипа rs6762529

Генотип	Индекс атерогенности Me (Q25–Q75)
TT + CC	3,06 (2,24–3,87)
CT	2,60 (2,04–3,32)

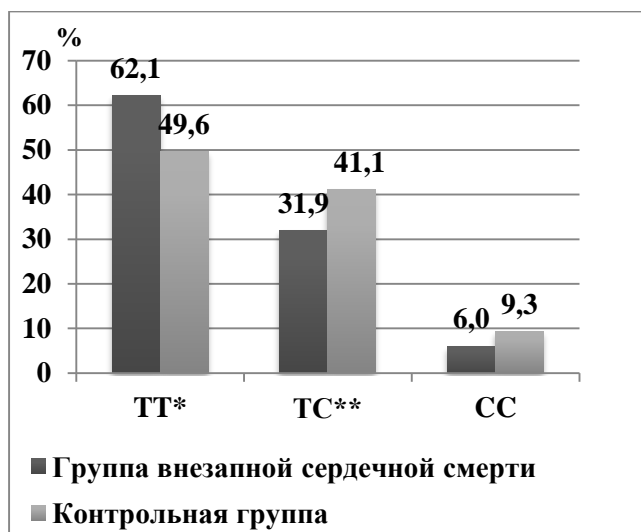
Примечание: Me – медиана, Q25 – 25-й процентиль, Q75 – 75-й процентиль

В группе внезапной сердечной смерти доля носителей генотипа TT rs12170546 гена *PARVB* больше (62,1 %), а генотипа TC меньше (31,9 %), чем в контрольной группе (49,6 %, 31,9 %).

41,1 %, соответственно) (ТТ vs ТС + СС: ОШ = 1,66, 95 % ДИ 1,25–2,21, $p = 0,001$; ТС vs ТТ + СС: ОШ = 0,67, 95 % ДИ 0,50–0,90, $p = 0,009$, соответственно) (рисунок 6).

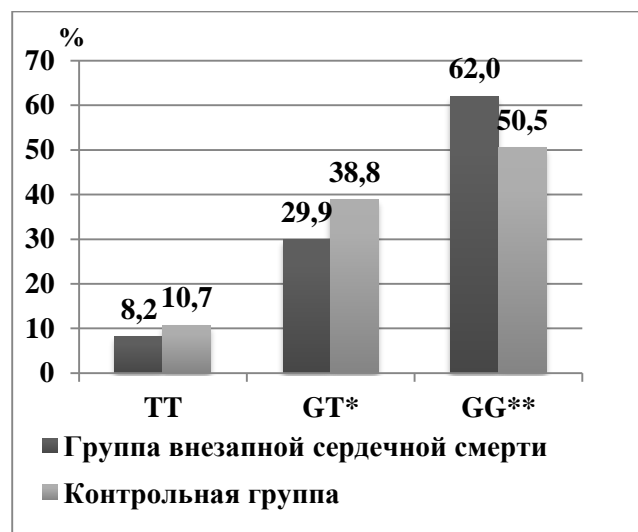
Доля носителей генотипа GT rs6582147 меньше в группе внезапной сердечной смерти (29,9 %) по сравнению с контрольной группой (38,8 %) (GT vs GG + TT: ОШ = 0,671, 95 % ДИ 0,496–0,909, $p = 0,011$), а доля носителей генотипа GG полиморфизма больше в группе внезапной сердечной смерти (62,0 %) по сравнению с контрольной группой (50,5 %) (GG vs GT + TT: ОШ = 1,60, 95 % ДИ 1,20–2,14, $p = 0,002$) (рисунок 7).

В возрасте до 50 лет в группе внезапной сердечной смерти частота носителей генотипа GG rs16994849 гена *PLCB1* выше (6,6 %), а генотипа AA ниже (67,6 %) по сравнению с контрольной группой (1,4 %, 79,5 %, соответственно) (GG vs AG + AA: ОШ = 4,92, 95 % ДИ 1,01–23,20, $p = 0,032$; AA vs GG + AG: ОШ = 0,54, 95 % ДИ 0,31–0,93, $p = 0,029$, соответственно) (рисунок 8). В группе мужчин старше 50 лет умерших внезапной сердечной смертью доля носителей генотипа GG меньше (0,6 %), чем в контрольной группе (5,3 %) соответствующего пола и возраста (GG vs AG + AA: ОШ = 0,11, 95 % ДИ 0,01–0,91, $p = 0,024$) (рисунок 9).



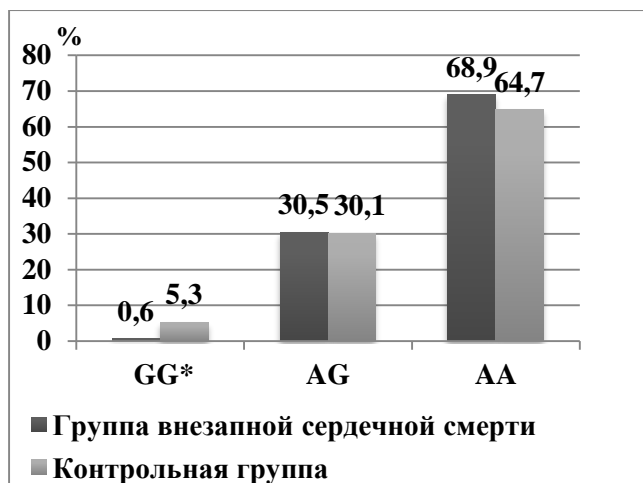
Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 6 – Частоты генотипов rs12170546 гена *PARVB* в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе



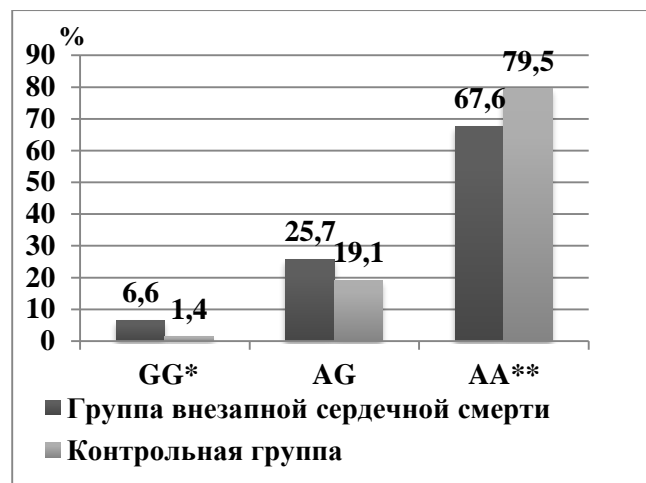
Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 7 – Частоты генотипов rs6582147 в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 8 – Частоты генотипов rs16994849 гена *PLCB1* в группе мужчин старше 50 лет



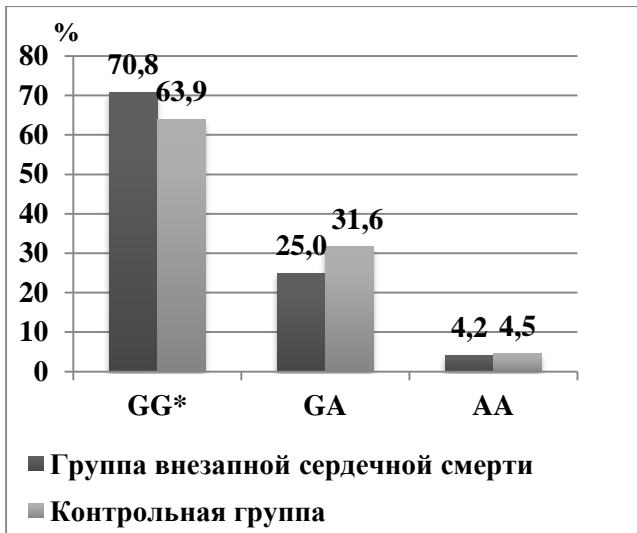
Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 9 – Частоты генотипов rs16994849 гена *PLCB1* в группе до 50 лет

Генотип GG rs2136810 ассоциирован с повышенным риском внезапной сердечной смерти, генотип GA полиморфизма ассоциирован с протективным эффектом в отношении внезапной сердечной смерти в группе лиц старше 50 лет: частота генотипа GG rs2136810 выше в группе внезапной сердечной смерти (70,8 %) по сравнению с контрольной группой (63,9 %) (GG vs GA + AA: ОШ = 1,37, 95 % ДИ 1,005–1,87, $p = 0,049$) (рисунок 10). У лиц старше 50 лет частота генотипа GA в группе внезапной сердечной смерти ниже (22,6 %), чем в контрольной группе (31,3 %) (GA vs GG + AA: ОШ = 0,64, 95 % ДИ 0,42–0,98, $p = 0,045$) (рисунок 11).

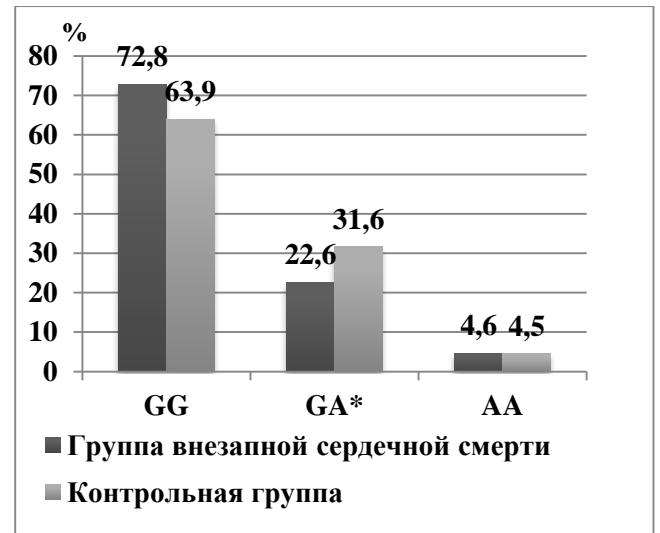
Носители генотипа CT rs10010305 чаще встречаются в группе мужчин умерших внезапной сердечной смертью (18,8 %) по сравнению с контрольной группой мужчин (11,6 %) (CT vs TT + CC: ОШ = 1,77, 95 % ДИ 1,09–2,90, $p = 0,027$) (рисунок 12). Данная закономерность также значима в группе лиц старше 50 лет, мужчин старше 50 лет. То есть, генотип CT rs10010305 является генотипом риска внезапной сердечной смерти в группе мужчин, группе лиц старшего возраста и группе мужчин старше 50 лет.

В контрольной группе частота носителей генотипа TT rs35089892 гена *SAMK2B* больше (10,6 %), чем в группе внезапной сердечной смерти (5,9 %) (TT vs TC + CC: ОШ = 0,52, 95 % ДИ 0,31–0,89, $p = 0,018$) (рисунок 13): генотип TT полиморфизма обладает протективным эффектом в отношении внезапной сердечной смерти.



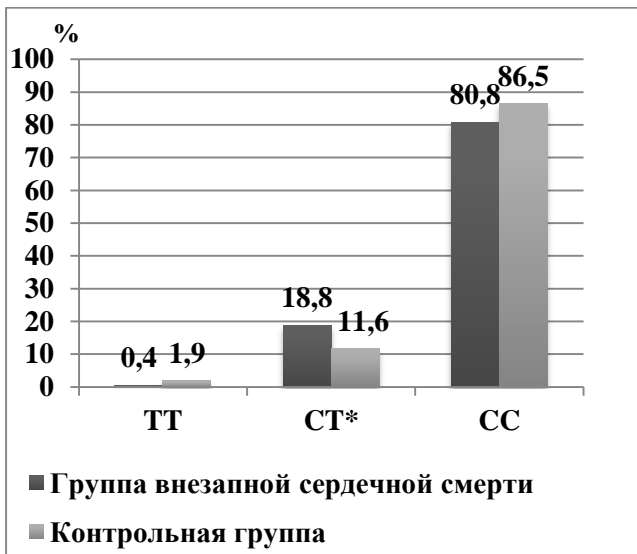
Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 10 – Частоты генотипов rs2136810 в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе



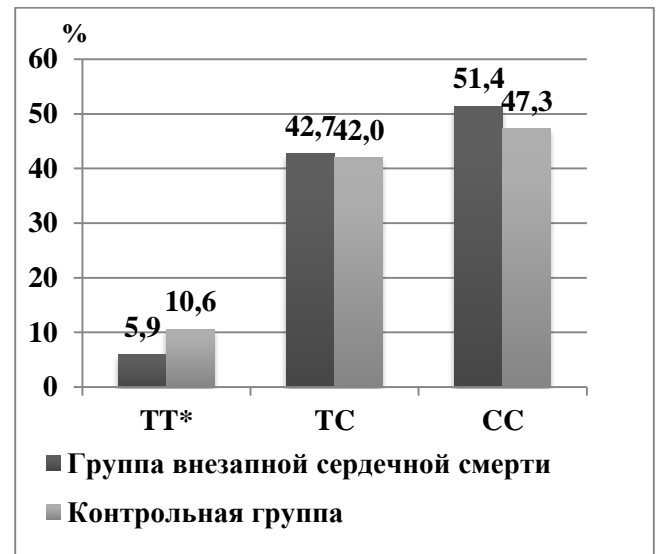
Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 11 – Частоты генотипов rs2136810 в группе старше 50 лет



Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 12 – Частоты генотипов rs10010305 в группе мужчин



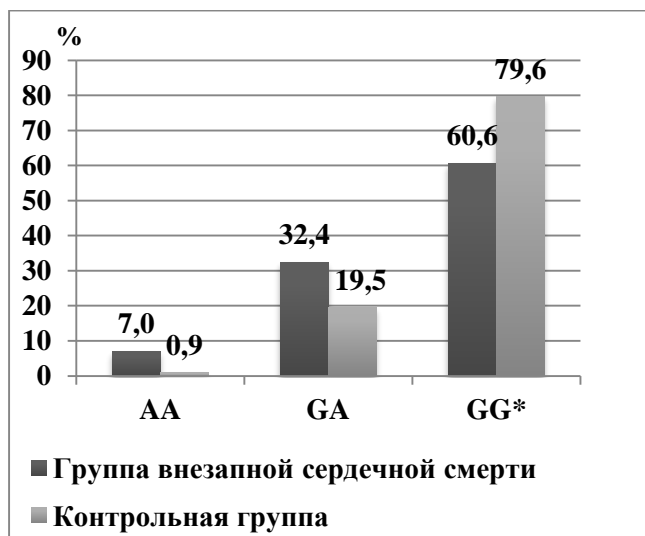
Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 13 – Частоты генотипов rs35089892 гена *СAMK2B*

В группе женщин вероятность встретить носительниц генотипа GG rs17797829 меньше в группе внезапной сердечной смерти (60,6 %) по сравнению с контрольной группой

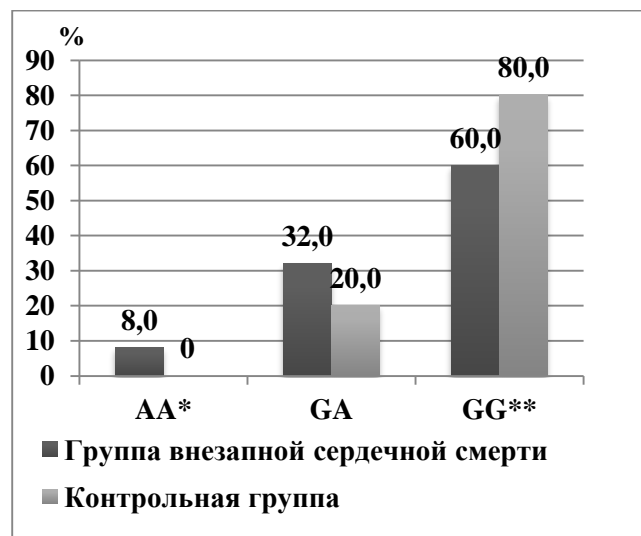
(79,6 %) (GG vs AA + GA: ОШ = 0,39, 95 % ДИ 0,20–0,76, p = 0,007) (рисунок 14). В группе женщин старше 50 лет кроме статистической значимости по частоте генотипа GG зафиксировано различие по частотам генотипа AA (AA vs GA + GG: ОШ = 2,74, 95 % ДИ 2,18–3,45, p = 0,02): в группе внезапной сердечной смерти частота генотипа AA (8,0 %) значимо больше, чем в контрольной группе (0) (рисунок 15). То есть в группе женщин генотип GG rs17797829 является протективным в отношении внезапной сердечной смерти. В группе женщин старше 50 лет кроме генотипа GG с внезапной сердечной смертью ассоциирован генотип AA полиморфизма, который является генотипом риска внезапной сердечной смерти.

Для лиц младше 50 лет доля носителей генотипа CC rs61999948 статистически значимо больше в группе внезапной сердечной смерти (59,0 %) по сравнению с контрольной группой (42,6 %) (CC vs TT + CT: ОШ = 1,94, 95 % ДИ 1,21–3,12, p = 0,006) (рисунок 16). В группе внезапной сердечной смерти rs61999948 ассоциирован с атеросклерозом по данным судебно-медицинского исследования. В группе без признаков атеросклеротического поражения коронарных сосудов и аорты доля носителей генотипа TT значимо больше (13,5 %), чем в группе лиц с атеросклеротическим поражением коронарных сосудов и аорты (5,7 %) (ОШ = 2,57, 95 % ДИ 1,25–5,27, p = 0,011) (таблица 2).



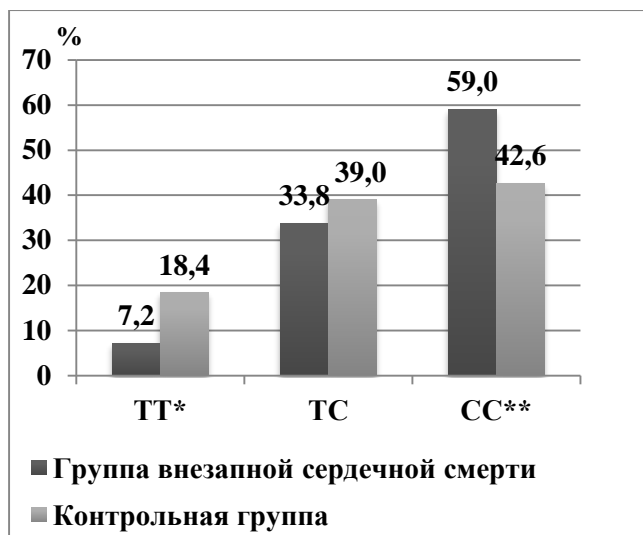
Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 14 – Частоты генотипов rs17797829 в группе женщин



Примечание:* указывает на статистически значимые различия

Рисунок 15 – Частоты генотипов rs17797829 в группе женщин старше 50 лет



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 16 – Частоты генотипов rs61999948 в группе лиц до 50 лет

Таким образом, по результатам первого этапа научно-исследовательской работы, были выявлены однонуклеотидные варианты, ассоциированные с внезапной сердечной смертью. Некоторые варианты (rs6874185, rs10867772, rs4700290, rs75555045, rs7164665, rs71461059, rs62116755, rs78143315, rs13246896, rs7172856) не подтвердили свою ассоциацию с внезапной сердечной смертью, несмотря на то, что по результатам полногеномного аллелотипирования они с большой долей вероятности могли быть новыми молекулярно-генетическими маркерами внезапной сердечной смерти. Все однонуклеотидные варианты, включенные в первый этап работы, по данным доступной научной литературы не были изучены в отношении связи с каким-либо заболеванием или состоянием, поэтому сопоставить полученные результаты с данными мировых или российских исследований не представляется возможным.

Проведена оценка ассоциации с внезапной сердечной смертью комбинаций найденных рисков полиморфизмов. В группе внезапной сердечной смерти количество умерших с комбинацией рисков генотипов полиморфизма rs10010305 (CT) и rs17797829 (AA) значимо больше (1,26 %) по сравнению с контрольной группой (0 %) ($p = 0,049$, ОШ = 2,14, 95 % ДИ 1,97–2,32). Важно отметить, что ассоциация данной комбинации полиморфизмов с риском внезапной сердечной смерти получена на общей группе, без разделения по полу и возрасту. Хотя предыдущие данные показали ассоциацию rs10010305 с внезапной сердечной смертью в группе мужчин, лиц старше 50 лет, мужчин старше 50 лет, а

Таблица 2 – Признаки атеросклероза коронарных сосудов и аорты в группе внезапной сердечной смерти в зависимости от генотипа rs61999948

Генотип	Отсутствие признаков атеросклероза	Наличие признаков атеросклероза
TT	13,5%	5,7%
CC+TC	86,5%	94,3%

rs17797829 с внезапной сердечной смертью в группе женщин старше 50 лет. Также комбинация генотипа AA rs34554140 и генотипа AA rs6670279, и комбинация генотипа GG rs2136810 и GG rs6582147 ассоциированы с повышенным риском внезапной сердечной смерти: носители комбинации генотипов AA rs34554140 и rs6670279 встречаются чаще в группе внезапной сердечной смерти (48,5 %) по сравнению с контрольной группой (37,9 %) ($p < 0,001$, ОШ = 2,05, 95 % ДИ 1,51–2,78), также как и носители комбинации генотипов GG rs2136810 и rs6582147 встречаются чаще в группе внезапной сердечной смерти (33,3 %) по сравнению с контрольной группой (24,8 %) ($p < 0,001$, ОШ = 1,81, 95 % ДИ 1,32–2,48). При этом отношение шансов в случае использования комбинации генотипов больше, чем в случае использования одного из генотипов отдельно.

Исследование мутаций, выявленных методом полноэкзомного секвенирования в зарубежных исследованиях

Мутации 9928_9929insE, D4301N и I22160T гена *TTN*, A1744S гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2* были обнаружены в числе ультраредких однонуклеотидных вариантов, которые отсутствуют в доступных экзомных базах данных, в ходе проведения посмертного полноэкзомного секвенирования и ген-специфичного анализа 117 генов кандидатов внезапной смерти у 14 внезапно умерших по неизвестной причине лиц европеоидной расы (средний возраст $17,4 \pm 8,6$ лет) (Narula N. et al., 2015). Миссенс-мутация R249Q гена *MYH7* была обнаружена в случае внезапно умершего во сне подростка также методом полноэкзомного секвенирования (Lorogcaro C.G. et al., 2014). Мутация Y1495X гена *SCN5A* найдена методом полноэкзомного секвенирования у умершего 48-летнего мужчины с семейным анамнезом внезапной сердечной смерти и синкопальными состояниями в покое (Tan Z.P. et al., 2014). Было предположено, что исследуемые мутации могут быть найдены в случае внезапной сердечной смерти у жителей г. Новосибирска.

В ходе генотипирования группы внезапной сердечной смерти не было выявлено носителей редких аллелей мутаций D4301N и I22160T гена *TTN*, A1744S и R249Q гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, Y1495X гена *SCN5A*, также мутации не были найдены и в контрольной группе.

Найдены и подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру гетерозиготные носители мутации 9928_9929insE гена *TTN* (rs796866952) в группе внезапной сердечной смерти (4,1 %) и контрольной группе (3,8 %). Распределение частот генотипов мутации в контрольной группе соответствует равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0,15$). По частотам генотипов мутации 9928_9929insE гена *TTN* не найдено статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$).

Мутации A1744S гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, D4301N и I22160T гена *TTN*, A189T гена *JPH2* имеют низкую частоту редкого аллеля в популяции (менее 0,00003), для R249Q гена *MYH7*, Y1495X гена *SCN5A* частота редкого аллеля в популяции остается неизвестной. Только для мутации 9928_9929insE гена *TTN* частота инсерции в популяции является достаточной (0,011) для того, чтобы обнаружить носителя мутантного аллеля в контрольной группе. Поэтому факт отсутствия носителей редких аллелей 9 мутаций и выявленные гетерозиготные носители мутации 9928_9929insE гена *TTN* в контрольной группе являются достаточно закономерным.

Предполагалось, что носители исследуемых мутаций генов могут быть обнаружены в группе внезапной сердечной смерти, поскольку, во-первых, данные мутации были идентифицированы в отдельных случаях внезапной сердечной смерти методами секвенирования следующего поколения, во-вторых, ряд других мутаций генов, в которых локализованы исследуемые мутации, были также найдены связанными с внезапной сердечной смертью в зарубежных исследованиях. Но данное предположение не было подтверждено.

В случае мутации 9928_9929insE гена *TTN* найдены гетерозиготные носители как в группе внезапной сердечной смерти, так и в группе контроля, но при статистической обработке ассоциация мутации с внезапной сердечной смертью в изучаемой группе выявлена не была.

Экзомное секвенирование ДНК 37 молодых мужчин из группы внезапной сердечной смерти умерших внезапной сердечной смертью в возрасте до 45 лет

В 37 образцах найдено 11412 (в среднем 308 ± 30 вариантов на 1 образец) нуклеотидных замен в экзонах 205 проанализированных генов, из которых 5918 (160 ± 18 на 1 образец) - синонимичные замены, которые были сразу исключены из дальнейшего анализа. Оставшиеся 5494 варианта (миссенс-варианты, нонсенс-варианты, варианты со сдвигом рамки считывания, 3'- и 5'- варианты) в экзонах 205 генов прошли дальнейшую фильтрацию. Были исключены варианты часто встречающиеся в популяции (по данным GnomAD с частотой более 1 %), которые были отмечены в ClinVar как доброкачественные. Оставшиеся 803 варианта оценены согласно критериям патогенности, указанным в руководстве по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (Рыжкова О.П. и др., 2019).

Из 37 образцов ДНК лиц, умерших внезапной сердечной смертью при анализе результатов секвенирования 205 генов было обнаружено 34 варианта, которые могут иметь отношение к развитию фенотипа внезапной сердечной смерти в 18 случаях. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Варианты, вероятно ассоциированные с внезапной сердечной смертью

Образец	Ген	Положение (GRCh38.p13)	Экзон	ОНП, положение в кДНК, замена аминокислоты	Генотип	gnomAD
557	<i>KCNA5</i>	chr12: 5045111G>C	1	rs139614200, c.964G>C, p.Asp322His	GC	0,00009
	<i>TGFB3</i>	chr14: 75980568 T>A	1	c.326A>T, p. Asp109Val	TA	-
568	<i>TTN</i>	chr2: 178551011 G>A	286	rs774107448, c.86597C>T, p.Pro28866Leu	GA	0,00002
583	<i>ABCC9</i>	chr12:21910920 A>T	9	c.1070T>A, p.Leu357His	AT	-
2191	<i>TTN</i>	chr2: 178590626 G>A	254	rs727504479, c.56176C>T, p.Arg18726Trp	GA	0,00006
		chr2: 178621685 T>G	195	rs764583221, c.40216A>C, p.Thr13406Pro	TG	0,000004
	<i>FLNC</i>	chr7: 128849379 C>T	30	rs753945728,c.5000C>T, p.Thr1667Met	CT	0,00003
3005	<i>CACNA1C</i>	chr12: 2688702 G>A	46	rs199473660, c.6040G>A, p.Val2014Ile	GA	0,0003
3006	<i>COL3A1</i>	chr2: 189006937 G>T	44	rs1559061954, c.3202G>T, p.Gly1068Cys	GT	-
3012	<i>FLNC</i>	chr7: 128840655 G>A	10	rs201572079, c.1657G>A, p.Gly553Ser	GA	0,0003
	<i>SCN10A</i>	chr3: 38722291 G>C	20	rs145568435, c.3474C>G, p.Ile1158Met	GC	0,00007
3013	<i>FLNC</i>	chr7: 128838696 C>T	8	rs199935488, c.1304C>T, p.Thr435Met	CT	0,00005
3015	<i>TSM</i>	chr12: 57796461 C>T	7	rs201754030, c.919C>T, p.Gln307Ter	CT	0,002
	<i>MYH7</i>	chr14: 23427657 C>T	16	rs121913627, c.1816G>A, p. Val606Met	CT	0,000007
3016	<i>SCN2B</i>	chr11: 118168683 G>A	2	rs752526094, c.139C>T, p.Arg47Cys	GA	0,000008
3017	<i>TTN</i>	chr2: 178539823 G>A	301	rs72648272, c.93319C>T, p.Arg31107Cys	GA	0,004
		chr2: 178562616 C>T	275	rs376820301, c.78593G>A, p.Arg26198Gln	CT	0,0003

Продолжение таблицы 3

Образец	Ген	Положение (GRCh38.p13)	Экзон	ОНП, положение в кДНК, замена аминокислоты	Генотип	gnomAD
3019	<i>DSP</i>	chr6: 7542003 G>A	1	rs121912998, с.88G>A, p.Val30Met	GA	0,002
3020	<i>CASQ2</i>	chr1:115738260 T>G	4	rs765848850, с.496A>C, p.Lys166Gln	TG	-
		chr1:115738262 A>G	4	с.494T>C, p.Ile165Thr	AG	0,000004
3023	<i>CSRP3</i>	chr11: 19188286 A>G	3	rs104894205, с.131T>C, p.Leu44Pro	AG	0,00001
	<i>RYR2</i>	chr1:237784338 C>G	90	с.12626C>G, p.Ser4209Trp	CG	-
3024	<i>APOB</i>	chr2: 21010846 C>T	26	с.6022G>A, p.Glu2008Asn	CT	-
	<i>TTN</i>	chr2: 178553619 C>T	283	rs72648237, с.84463G>A, p.Val28155Met	CT	0,001
		chr2: 178565869 A>G	275	rs200181804, с.75340T>C, p.Phe25114Leu	AG	0,0002
3026	<i>PKP2</i>	chr12: 32878461 G>A	3	rs150821281, с.419C>T, p.Ser140Phe	GA	0,002
	<i>CREB3L3</i>	chr19:4168367 T>TG	6	rs780374391, с.732dup, p.Lys245fs	TTG	0,0004
3028	<i>KCND3</i>	chr1:111777146 C>T	7	rs35027371, с.1646G>A, p.Arg549His	CT	0,0001
	<i>KCNH2</i>	chr7: 150948483 G>A	11	rs143512106, с.2653C>T, p.Arg885Cys	GA	0,0002
	<i>SNTA1</i>	chr20: 33412652 C>T	4	rs770192754, с.832G>A, p.Glu278Lys	CT	0,00001
	<i>TGFB3</i>	chr14: 75971659 A>C	2	rs201453600, с.412T>G, p.Ser138Ala	AC	0,0001
3029	<i>AKAP9</i>	chr7: 92065290 G>A	26	rs61757671, с.6070G>A, p.Glu2024Lys	GA	0,001
	<i>ANKRD1</i>	chr10:90915638 C>A	8	с.754G>T, p.Gly252Ter	CA	-
	<i>TTN</i>	chr2: 178672473 C>T	150	rs2020144 78, с.33742G>A, p.Val11248Ile	CT	0,003

Найденные мутации локализованы в генах, ассоциированных с фенотипами, приводящими к развитию внезапной сердечной смерти (ГКМП, ДКМП, нарушения ритма сердца).

Впервые описаны редкие варианты генов *TGFB3* (chr14: 75980568 T>A, c.326A>T, p. Asp109Val), *ABCC9* (chr12:21910920 A>T, c.1070T>A, p.Leu357His), *APOB* (chr2: 21010846 C>T, c.6022G>A, p.Glu2008Asn), *CASQ2* (chr1:115738262 A>G, c.494T>C, p.Ile165Thr), *RYR2* (chr1:237784338 C>G, c.12626C>G, p.Ser4209Trp), *ANKRD1* (chr10:90915638 C>A, c.754G>T, p.Gly252Ter).

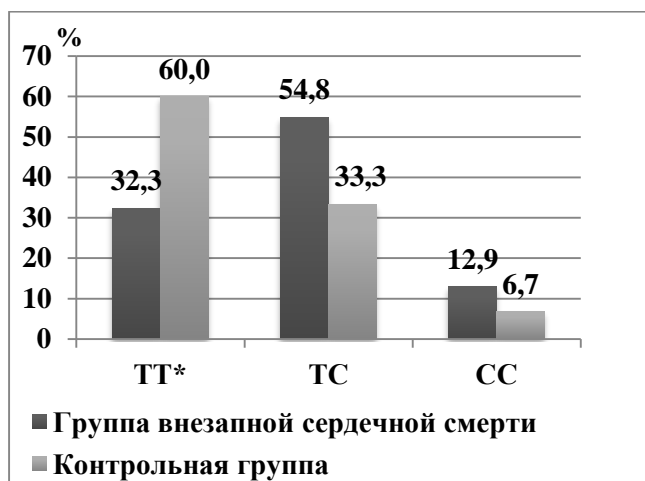
Таким образом, проведенное исследование – первое такое исследование в России. Внезапная сердечная смерть - сложный фенотип в основе, которого могут лежать мутации в более чем в 100 генах (по некоторым оценкам – около 200 генов), что существенно повышает сложность решаемой задачи и объём работы, который необходимо выполнить по каждому образцу. Тем не менее, уже первые результаты по эффективности поиска причинных мутаций сопоставимы с данными зарубежных исследований. Необходимо продолжение исследований в области молекулярной аутопсии в России. Для повышения результативности поиска причинных мутаций желательное снижение возраста случаев внезапной сердечной смерти включаемых в исследование, работа с семьями умерших внезапной сердечной смертью, сотрудничество опытных специалистов – судебно-медицинского эксперта, лабораторного генетика, биоинформатика, кардиолога.

Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов, выявленных при анализе результатов экзомного секвенирования

При анализе результатов экзомного секвенирования 37 мужчин, умерших внезапной сердечной смертью в возрасте до 45 лет получен список возможных новых молекулярно-генетических маркеров (ОНП, частота редкого аллеля которых полученная по результатам экзомного секвенирования в группе внезапной сердечной смерти значимо отличается от популяционной частоты для европеоидной расы по данным базы gnomAD). Список (rs34643859 гена *KCNS1*, rs12804550 гена *SCN4B*, rs4514993 гена *SCN11A*, rs1008832 гена *CACNA1C*, rs4027402 гена *SYNE2*, rs2340917 гена *TMEM43*, rs58225473 гена *CACNB2*) содержит ОНП генов-кандидатов внезапной сердечной смерти и заболеваний, лежащих в ее основе (ИБС, нарушений ритма сердца). Отобранные ОНП ранее не были изучены в отношении внезапной сердечной смерти.

В контрольной группе наблюдаемые частоты генотипов ОНП rs34643859, rs12804550, rs4514993, rs1008832, rs4027402, rs2340917, rs58225473 соответствуют ожидаемым согласно равновесию Харди-Вайнберга ($\chi^2 = 0,08; 0,14; 0,21; 1,37; 2,34; 1,05; 0,37$, соответственно).

В группе женщин в возрасте до 50 лет выявлено уменьшение частот генотипа ТТ и аллеля Т rs34643859 в группе внезапной сердечной смерти (32,3%; 57,6%, соответственно) по сравнению с контрольной группой (60,0%; 76,7%, соответственно) (ОШ = 0,32, 95% ДИ 0,11–0,91, $p = 0,04$; ОШ = 0,41, 95% ДИ 0,19–0,91, $p = 0,03$, соответственно) (рисунок 17). В группе внезапной сердечной смерти найдена ассоциация rs34643859 с толщиной миокарда правого желудочка: у носителей редкого гомозиготного генотипа СС толщина миокарда правого желудочка значимо больше по сравнению с носителями генотипов ТТ и ТС ($p = 0,009$) (таблица 4). В контрольной группе найдена ассоциация полиморфизма rs34643859 с частотой сердечных сокращений: у носителей редкого гомозиготного генотипа СС частота сердечных сокращений значимо больше по сравнению с носителями генотипов ТТ и ТС ($p = 0,023$) (таблица 5).



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 17 – Частоты генотипов rs34643859 в группе женщин младше 50 лет

Таблица 4 – Толщина миокарда правого желудочка в группе внезапной сердечной смерти в зависимости от генотипа rs34643859

Генотип	Толщина миокарда правого желудочка Ме (Q25–Q75), см
СС	0,5 (0,425–0,6)
СТ + ТТ	0,4 (0,3–0,5)

Примечание: Ме – медиана, Q25 – 25-й процентиль, Q75 – 75-й процентиль

Таблица 5 – Частота сердечных сокращений в зависимости от генотипа rs34643859 в группе контроля

Генотип	(Q25–Q75), см
СС	81,7 (73,2–88,5)
СТ + ТТ	70,7 (64,0–78,3)

Примечание: Ме – медиана, Q25 – 25-й процентиль, Q75 – 75-й процентиль

Таким образом, согласно полученным результатам, можно предположить, что для женщин младше 50 лет генотип ТТ полиморфизма rs34643859 связан с протективным эффектом в отношении внезапной сердечной смерти. Возможно, вклад полиморфизма гена в феномен внезапной сердечной смерти реализуется через изменение частоты сердечных сокращений и изменение толщины стенки миокарда правого желудочка. Так как полиморфизм локализован в гене, кодирующем компонент калиевого канала, то полученные данные по связи полиморфизма с частотой сердечных сокращений можно считать закономерными.

По частотам генотипов и аллелей полиморфизмов rs12804550, rs4514993, rs1008832, rs4027402, rs2340917, rs58225473 не найдено статистически значимых различий между группой внезапной сердечной смерти и контрольной группой ($p > 0,05$), то есть изученные однонуклеотидные полиморфизмы не ассоциированы с внезапной сердечной смертью по результатам проведенного исследования.

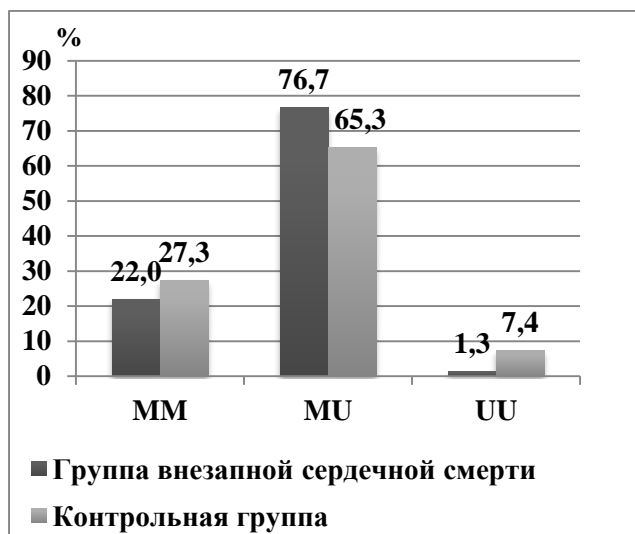
Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью метилирования отдельных генов

В группе внезапной сердечной и несердечной смерти проведена оценка статуса метилирования генов *ABCA1*, *HMGCR*, *F2RL3*, *CDKN2A*, метилирование которых ассоциировано с ИБС или ее исходами по данным международных исследований.

В группе внезапной сердечной смерти у 22 % (33/150) промотор гена *ABCA1* полностью метилирован (ММ); у 1,3 % (2/150) полностью неметилирован (UU); у 76,7 % (115/150) обнаружен как метилированный, так и неметилированный промотор гена (MU). В контрольной группе у 27,3 % (41/150) промотор гена *ABCA1* полностью метилирован; у 7,4 % (11/150) полностью неметилирован; у 195 65,3 % (98/150) обнаружен как метилированный, так и неметилированный промотор гена (рисунок 18).

При сравнении групп выявлены статистически значимые различия по статусу метилирования промотора гена *ABCA1* между группами ($p = 0,015$). В группе внезапной сердечной смерти доля лиц, у которых промотор гена *ABCA1* метилирован, статистически значимо больше по сравнению с контрольной группой (ММ + MU vs UU: ОИШ = 5,86, 95 % ДИ 1,28–26,89, $p = 0,020$). Таким образом, по полученным данным метилирование промотора гена *ABCA1* ассоциировано с риском внезапной сердечной смерти. Согласно данным мировой научной литературы ранее исследований по поиску связи метилирования промотора гена *ABCA1* с внезапной сердечной смертью проведено не было. Однако, в зарубежных

исследованиях показано, что метилирование промотора гена ассоциировано с риском ИБС, нарушениями липидного гомеостаза.



Примечание: * указывает на статистически значимые различия

Рисунок 18 – Статус метилирования промотора гена *ABCA1* в группе внезапной сердечной смерти и контрольной группе

При сравнении групп не выявлено статистически значимых различий по статусу метилирования генов *HMGCR*, *F2RL3* между группами ($p > 0,05$). У всех исследуемых в обеих группах CpG-островок гена *CDKN2A* (9:21974726-21974877, GRCh38.p13) полностью неметилирован.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования с помощью различных методов молекулярно-генетического анализа изучен ряд молекулярно-генетических маркеров внезапной сердечной смерти.

На пулированной ДНК проведено полногеномное аллелотипирование, позволившее получить перечень однонуклеотидных вариантов генов, которые могут быть новыми молекулярно-генетическими маркерами внезапной сердечной смерти. Ранее связь этих вариантов нуклеотидной последовательности с внезапной сердечной смертью не предполагалась, они локализованы в межгенных пространствах или в генах, не

рассматривавшихся ранее как гены-кандидаты внезапной сердечной смерти. Из полученного перечня однонуклеотидных полиморфизмов 22 отобрано для дальнейшей верификации в исследовании дизайна «случай-контроль» с помощью рутинных методов – полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов в полиакриламидном геле. Верификация результатов является необходимым этапом для исключения ложноположительных маркеров (Teumer A. et al., 2013). По результатам этой части работы выявлено 12 однонуклеотидных вариантов, генотипы которых являются генотипами риска внезапной сердечной смерти или обладают протективным эффектом в ее отношении как в общей группе, так и в отдельных половых и возрастных подгруппах. Проведенный анализ комбинаций генотипов разных вариантов нуклеотидной последовательности позволил выявить комбинации однонуклеотидных вариантов, ассоциированные с внезапной сердечной смертью, использование которых в оценке риска внезапной сердечной смерти имеет большую значимость, чем использование одиночных генотипов.

Проведен поиск мутаций генов в группе внезапной сердечной смерти, ранее найденных в отдельных случаях внезапной сердечной смерти и внезапной необъясненной смерти по результатам полноэкзомного секвенирования в зарубежных исследованиях. Только одна из исследованных мутаций была идентифицирована в группе внезапной сердечной смерти и в контрольной группе. При этом статистически значимых различий между группами по частотам генотипов мутации найдено не было. Таким образом, показано, что перед использованием результатов зарубежных исследований на нашей популяции требуется их проверка.

Выполнено экзомное секвенирование группы молодых мужчин (37 человек) умерших внезапной сердечной смертью в возрасте до 45 лет. По результатам анализа 205 генов, имеющих отношение к фенотипам, предрасполагающим к внезапной сердечной смерти (синдром удлиненного интервала QT, катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия, синдром Бругада, синдром укороченного интервала QT, нарушения сердечной проводимости, фибрилляция предсердий, синдром слабости синусового узла, ГКМП, ДКМП, аритмогенная кардиомиопатия, генетически обусловленные нарушения метаболизма липопротеинов) найдено 34 варианта, которые могут иметь отношение к внезапной сердечной смерти. То есть, показана эффективность использования метода экзомного секвенирования при поиске причинных замен внезапной сердечной смерти почти в половине случаев внезапной сердечной смерти, что подтверждает необходимость проведения,

рекомендованного посмертного молекулярно-генетического анализа при внезапной сердечной смерти. Однако в 19 случаях не было обнаружено редких вариантов нуклеотидной последовательности генов, которые могли бы быть причинными для развития внезапной сердечной смерти. **Внезапная сердечная смерть** - сложный фенотип в основе, которого могут лежать мутации в более чем в 100 генах (по некоторым оценкам - около 200 генов), что существенно повышает сложность интерпретации данных, полученных методами секвенирования следующего поколения. Тем не менее, результаты проведенного исследования показывают эффективность поиска причинных мутаций для фенотипа внезапной сердечной смерти. Кроме того, необходимо отметить, что у некоторых мужчин, включенных в исследование было выявлено носительство однонуклеотидных вариантов нескольких генов, что говорит о возможной олигогенности исследуемой нозологии. Необходимо продолжение исследований в области молекулярной аутопсии в России. Для повышения результативности поиска причинных мутаций необходима работа с семьями умерших внезапной сердечной смертью, сотрудничество опытных специалистов – судебно-медицинского эксперта, лабораторного генетика, биоинформатика и кардиолога.

По результатам экзомного секвенирования отобрано 7 однонуклеотидных вариантов, частота редкого аллеля которых по данным экзомного секвенирования отличалась от популяционных данных по gnomAD. Было предположено, что выбранные варианты нуклеотидной последовательности могут быть ассоциированы с внезапной сердечной смертью. Проведено верификационное исследование дизайна «случай-контроль» с помощью рутинных методов – полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов в полиакриламидном геле. Только 1 из 7 полиморфизмов показал ассоциацию с внезапной сердечной смертью, при этом ассоциация была выявлена только для женщин младше 50 лет.

Выполнено исследование ассоциации метилирования CpG-островков 4 генов с внезапной сердечной смертью. По результатам проведенного анализа найден 1 ген, метилирование промотора которого ассоциировано с внезапной сердечной смертью.

Таким образом, проведен большой комплекс молекулярно-генетических исследований с использованием современных методов молекулярно-генетического анализа (полногеномное аллелотипирование на пулированной ДНК, экзомное секвенирование, ряд верифицирующих исследований рутинным методом полимеразной цепной реакции, эпигенетическое исследование - исследование метилирования CpG-островков нескольких генов), что позволило выявить ряд новых маркеров внезапной сердечной смерти (редких и

частых вариантов нуклеотидной последовательности, метилирование промотора гена). Полученные результаты подтверждают генетическую сложность феномена внезапной сердечной смерти. В генетическом патогенезе данной мультифакторной нозологии играют роль огромное количество молекулярно-генетических маркеров: мутации генов, которые связаны с развитием фенотипов, предрасполагающих к внезапной сердечной смерти или непосредственно с самой внезапной сердечной смертью, частые варианты нуклеотидной последовательности, локализованные в генах и межгенных пространствах, которые ассоциированы с риском внезапной сердечной смерти, эпигенетические факторы (метилирование ДНК).

Выполненная крупная поисковая работа включает в себя исследование только части молекулярно-генетических факторов, которые могут быть изучены при данной нозологии. Как показывают результаты выполненной работы, частые варианты нуклеотидной последовательности, которые изменяют риск внезапной сердечной смерти, часто локализованы вне генов или в генах, связь которых с внезапной сердечной смертью неочевидна, что говорит о том, что большое число маркеров нозологии может быть локализовано вне известных нам генетических локусов. Также показано, что комбинации генотипов нескольких вариантов могут быть ассоциированы с большим риском внезапной сердечной смерти, что требует более детального изучения. Кроме того, по результатам проведенного исследования становится понятно, что эпигенетические маркеры важны в развитии внезапной сердечной смерти, и требуется продолжение исследования не только метилирования ДНК, но и других эпигенетических механизмов (исследование посттрансляционной модификации гистонов, длинных некодирующих РНК).

ВЫВОДЫ

1. В выборке умерших внезапной сердечной смертью в Октябрьском районе г. Новосибирска внезапная сердечная смерть ассоциирована с генотипами АА (ОШ = 1,85, $p = 0,002$) и АТ (ОШ = 0,53, $p = 0,001$) rs34554140, АА (ОШ = 1,54, $p = 0,005$) и АТ (ОШ = 0,73, $p = 0,047$) rs6670279, ТТ (ОШ = 1,66, $p = 0,001$) и ТС (ОШ = 0,67, $p = 0,009$) rs12170546 гена *PARVB*, GG (ОШ = 1,60, $p = 0,002$) и GT (ОШ = 0,67, $p = 0,011$) rs6582147, GG (ОШ = 1,38, $p = 0,049$) rs2136810 гена *ARAP2*, АА (ОШ = 0,57, $p = 0,014$) rs12904699 гена *OR4F6*, ТТ (ОШ = 0,52, $p = 0,018$) rs35089892 гена *SAMK2B*.

2. У мужчин внезапная сердечная смерть ассоциирована с генотипом CT (ОШ = 1,77, $p = 0,027$) rs10010305. У женщин внезапная сердечная смерть ассоциирована с генотипом GG (ОШ = 1,78, $p = 0,04$) rs12904699 гена *OR4F6*, GG (ОШ = 0,39, $p = 0,007$) rs17797829, у женщин старше 50 лет – с генотипом AA (ОШ = 2,74, $p = 0,02$) rs17797829, у женщин младше 50 лет – с генотипом TT rs34643859 гена *KCNS1* (ОШ = 0,32, $p = 0,04$).
3. У лиц старше 50 лет внезапная сердечная смерть ассоциирована с генотипом GG (ОШ = 0,11, $p = 0,024$) rs16994849 гена *PLCB1*, GA (ОШ = 0,64, $p = 0,045$) rs2136810 гена *ARAP2*, CT (ОШ = 0,69, $p = 0,035$) rs6762529 гена *NAALADL2*, CT (ОШ = 1,72, $p = 0,041$) rs10010305. У лиц младше 50 лет внезапная сердечная смерть ассоциирована с генотипами GG (ОШ = 4,92, $p = 0,032$) и AA (ОШ = 0,54, $p = 0,029$) rs16994849 гена *PLCB1*, CC (ОШ = 1,94, $p = 0,006$) и TT (ОШ = 0,34, $p = 0,007$) rs61999948.
4. С повышенным риском внезапной сердечной смерти ассоциированы комбинации генотипов риска полиморфизмов rs10010305 (CT) и rs17797829 (AA), rs34554140 (AA) и rs6670279 (AA), rs2136810 (GG) и rs6582147 (GG) (ОШ = 2,14, $p = 0,049$; ОШ = 2,05, $p < 0,001$; ОШ = 1,81, $p < 0,001$, соответственно).
5. У умерших внезапной сердечной смертью выявлена ассоциация между признаками атеросклероза аорты и коронарных артерий и генотипами полиморфизма rs61999948 ($p = 0,011$), толщиной миокарда правого желудочка и генотипами полиморфизма rs34643859 гена *KCNS1* ($p = 0,009$). У жителей г. Новосибирска найдена ассоциация между индексом атерогенности и генотипами полиморфизма rs6762529 гена *NAALADL2* ($p = 0,006$), частотой сердечных сокращений и генотипами полиморфизма rs34643859 гена *KCNS1* ($p = 0,023$).
6. Не выявлено случаев внезапной сердечной смерти, ассоциированной с мутациями D4301N и I22160T гена *TTN*, A1744S и R249Q гена *MYH7*, T171M гена *CACNA1C*, A189T гена *JPH2*, S434Y гена *VCL*, H4552R гена *RYR2*, Y1495X гена *SCN5A*. С внезапной сердечной смертью не ассоциирована мутация 9928_9929insE гена *TTN* ($p > 0,05$).
7. У 18 из 37 (48,7 %) мужчин с внезапной сердечной смертью до 45 лет найдены 34 вероятно причинных варианта нуклеотидной последовательности по результатам экзомного секвенирования при анализе 205 генов. Впервые описаны редкие варианты генов *TGFB3* (chr14: 75980568 T>A, c.326A>T, p. Asp109Val), *ABCC9* (chr12:21910920 A>T, c.1070T>A, p.Leu357His), *APOB* (chr2: 21010846 C>T, c.6022G>A, p.Glu2008Asn), *CASQ2* (chr1:115738262 A>G, c.494T>C, p.Ile165Thr), *RYR2* (chr1:237784338 C>G, c.12626C>G, p.Ser4209Trp), *ANKRD1* (chr10:90915638 C>A, c.754G>T, p.Gly252Ter).

8. Внезапная сердечная смерть ассоциирована с метилированием промотора гена *ABCA1* (ОШ = 5,86, $p = 0,02$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В случае внезапной сердечной смерти для поиска причинных вариантов нуклеотидной последовательности генов рекомендовано проведение молекулярной аутопсии методом экзомного секвенирования. Полученные данные могут быть использованы для профилактики и предупреждения развития внезапной сердечной смерти у родственников умершего.

Для стратификации риска внезапной сердечной смерти, особенно у молодых мужчин (спортсменов, лиц с профессиями тяжелого физического труда, отягощенной наследственностью), наряду с традиционными клиническими факторами риска может быть использован (после дополнительных репликационных исследований) молекулярно-генетический анализ на определение генотипов однонуклеотидных полиморфизмов rs34554140, rs6670279 гена *NAALADL2*, rs12904699 гена *OR4F6*, rs12170546 гена *PARVB*, rs6582147, rs2136810 гена *ARAP2*, rs16994849 гена *PLCB1*, rs17797829, rs35089892 гена *SAMK2B*, rs6762529 гена *NAALADL2*, rs10010305, rs61999948, rs34643859 гена *KCNS1*, и статуса метилирования промотора гена *ABCA1*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Исследование связи мутации R249Q гена *MYH7* с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. В. Савченко, М. И. Воевода // Медицинская генетика. – 2016. Т. 156 № 4. – С. 43–45. <https://doi.org/10.1234/XXXX-XXXX-2016-4-43-45>
2. Исследование связи мутации гена D4301N и I22160T гена *TTN* с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, К. Н. Колесник [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – № 5. – С. 24–34.
3. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью новых молекулярно-генетических маркеров, выявленных в собственном полногеномном ассоциативном исследовании / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. К. Малютин [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2017. – № 2. – С. 29–34.
4. Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs62116755 гена *GACAT3*, rs12170546 гена *PARVB*, rs16994849 гена *PLCB1*, rs78143315 гена *PDCD6IP* с внезапной сердечной

- смертью / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. К. Малютина [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2017. – № 10. – С. 23–28. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2017-10-23-28>
5. Новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти, выявленные методом секвенирования следующего поколения (NGS) / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. К. Малютина [и др.] // Молекулярная медицина. – 2018. – Т. 16, № 5ю – С. 30–35. <https://doi.org/10.29296/24999490-2018-05-05>
6. Однонуклеотидные варианты rs6582147, rs10010305, rs2136810, rs17797829 как новые молекулярно-генетические маркеры внезапной сердечной смерти. Российский кардиологический журнал / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, Д. И. Моисеева [и др.] // 2018. – № 10. – С. 64–69. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2018-10-64-69>
7. Исследование ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов rs7164665, rs71461059, rs74765750, rs6762529 с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. К. Малютина [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2019. – № 10. – С. 35–41. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2019-10-35-41>
8. Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs61999948, rs7172856 внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, В. Н. Максимов, С. К. Малютина [и др.] // Атеросклероз. – 2019. – Т. 15, № 4. – С. 33–38. <https://doi.org/10.15372/ATER20190402>
9. Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs75555045 и rs12904699 с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, Е. С. Мельникова, А. А. Гуражева [и др.] // Молекулярная медицина. – 2020. – Т. 18, № 5. – С. 36–40. <https://doi.org/10.29296/24999490-2020-05-05>
10. Метилирование промотора гена ABCA1 и внезапная сердечная смерть / **А. А. Иванова**, А. А. Гуражева, Е. И. Акиншина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т. 19, № 4. – С. 80–85. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2020-4-80-85>
11. Первые результаты секвенирования панели генов при внезапной сердечной смерти молодых мужчин / В. Н. Максимов, Д. Е. Иванощук, П. С. Орлов, **А. А. Иванова** [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19, № 5. – С. 36–38. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.05.36-38>
12. Исследование новых молекулярно-генетических маркеров внезапной сердечной смерти, выявленных при анализе результатов полноэкзомного секвенирования / **А. А. Иванова**, Е. С.

- Мельникова, А. А. Гуражева [и др.] // Медицинская генетика. – 2020. – Т. 19, № 5. – С. 33–35. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2020.05.33-35>
13. Секвенирование нового поколения при внезапной сердечной смерти (пилотное исследование) / В. Н. Максимов, Д. Е. Иванощук, П. С. Орлов, **А. А. Иванова** [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Т. 25, № 10. – С. 3880. <https://doi.org/10.15829/1560-4071-2020-3880>
14. Ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов rs10867772, rs4700290 с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, С. К. Малютина, В. П. Новоселов [и др.] // Атеросклероз. – 2021. – Т. 17, № 1. – С. 7–11. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-7-11>
15. Verification of Single Nucleotide Polymorphisms rs34554140, rs6670279, and rs6874185 as Novel Molecular Genetic Markers of Sudden Cardiac Death / **А. А. Ivanova**, A. A. Gurazheva, E. S. Melnikova [et al.] // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2021. – Vol. 13, N 2. – P. 40. <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.2.04>
16. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов rs34643859 гена *KCNS1*, rs12804550 гена *SCN4B*, rs4514993 гена *SCN11A* / **А. А. Иванова**, Е. С. Мельникова, А. А. Гуражева [и др.] // Молекулярная медицина. – 2021. – Т. 19, № 5. – С. 33–39. <https://doi.org/10.29296/24999490-2021-05-05>
17. Ассоциация метилирования генов *F2RL3* и *CDKN2A* с внезапной сердечной смертью / **А. А. Иванова**, А. А. Гуражева, С. В. Максимова [и др.] // Атеросклероз. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 6–10. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2021-17-4-6-10>
18. Метилирование промотора гена *HMGCR* и внезапная сердечная смерть / **А. А. Иванова**, А. А. Гуражева, Е. И. Акиншина [и др.] // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2021. – Т. 63, № 6. – С. 539–542. <https://doi.org/10.24022/0236-2791-2021-63-6-539-542>
19. **Ivanova A.A.** Role of DNA Methylation in Development of Cardiovascular Diseases, Resulting in a Sudden Cardiac Death (Review) / **А. А. Иванова**, S. V. Maksimova, A. A. Gurazheva // *Sovremennye tehnologii v medicine*. – 2022. – Vol. 14, N 1. – P. 83. <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.1.08>
20. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов rs1008832 гена *CACNA1C*, rs4027402 гена *SYNE2*, rs2340917 гена *TMEM43*, rs58225473 гена *CACNB2* / **А. А. Иванова**, Е. С. Мельникова, А. А. Гуражева [и др.]

// Атеросклероз. – 2022. – Т. 18, № 1. – С. 38–45. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2022-18-1-38-45>

21. Внезапная сердечная смерть у молодых мужчин: результаты экзомного секвенирования / **А. А. Иванова**, Д. Е. Иванощук, П. С. Орлов [и др.] // Атеросклероз. – 2022. – Т. 18, № 4. – С. 317–337. <https://doi.org/10.52727/2078-256X-2022-18-4-317-337>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия

ДКМП – дилатационная кардиомиопатия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ОНП – однонуклеотидный полиморфизм

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания