

Анализ полиморфизма генов рецепторов врожденного иммунитета у пациентов с коронарным атеросклерозом и в популяционной выборке г. Новосибирска

С.В. Михайлова¹, Д.Е. Иванощук¹, П.С. Орлов¹, Л.Д. Латынцева², Е.В. Каштанова², Я.В. Полонская², Ю.И. Рагино², Е.В. Шахтшнейдер^{1,2}

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН

630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

² НИИ терапии и профилактической медицины – филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

Резюме

Понимание молекулярных механизмов атеросклеротического повреждения сосудов необходимо как для оценки рисков сердечно-сосудистых заболеваний, так и для поиска подходов к их терапии. Задача остается актуальной несмотря на большое число проведенных исследований, так как существуют различия в факторах генетической предрасположенности к атеросклерозу и его осложнениям между представителями различных этнотерриториальных групп. Целью данного исследования был поиск генетических вариантов паттерн-распознающих рецепторов, ассоциированных с нарушениями липидного обмена, которые могут приводить к развитию коронарного атеросклероза. **Материал и методы.** Выполнен анализ последовательностей экзонов и прилежащих сайтов сплайсинга генов паттерн-распознающих рецепторов у пациентов с коронарным атеросклерозом (30 мужчин), а затем генотипирование популяционной выборки г. Новосибирска ($n = 1441$) методом ПЦР в реальном времени по отобранному rs113706342 гена *TLR1* и анализ ассоциации его носительства с показателями липидного обмена. **Результаты и их обсуждение.** Частота минорного аллеля rs113706342 С гена *TLR1* в выборке жителей г. Новосибирска составила $0,0114 \pm 0,0062$, носительство этого варианта было ассоциировано с повышенным уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности как у женщин, так и у мужчин ($p = 0,009$ и $p = 0,019$ соответственно). Носительницы минорного аллеля С rs113706342 имели также статистически значимое увеличение содержания общего холестерина сыворотки ($p = 0,013$) по сравнению с гомозиготами ТТ. Для проверки роли этого варианта в развитии коронарного атеросклероза необходимо генотипирование расширенной выборки пациентов. У одного из обследованных с коронарным атеросклерозом найден ранее не описанный однонуклеотидный вариант chr16:3614637 G/C, приводящий к замене Leu101Val в гене *NLRC3*, для оценки его функциональной значимости необходим сегрегационный анализ. **Заключение.** Показана ассоциация rs113706342 С гена *TLR1* с нарушением липидного обмена в российской популяции.

Ключевые слова: коронарный атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, секвенирование нового поколения, паттерн-распознающие рецепторы, однонуклеотидный вариант, ген *TLR1*, ген *NLRC3*, rs113706342.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке государственного бюджетного проекта FWNR-2022-0021.

Благодарности: Секвенирование ДНК выполняли с использованием оборудования ЦКП и «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Автор для переписки: Михайлова С.В., e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru

Для цитирования: Михайлова С.В., Иванощук Д.Е., Орлов П.С., Латынцева Л.Д., Каштанова Е.В., Полонская Я.В., Рагино Ю.И., Шахтшнейдер Е.В. Анализ полиморфизма генов рецепторов врожденного иммунитета у пациентов с коронарным атеросклерозом и в популяционной выборке г. Новосибирска. *Сибирский научный медицинский журнал.* 2023;43(4):97–109. doi: 10.18699/SSMJ20230410

Analysis of polymorphism of innate immunity receptor genes in patients with coronary atherosclerosis and in a population sample from Novosibirsk

S.V. Mikhailova¹, D.E. Ivanoshchuk¹, P.S. Orlov¹, L.D. Latyntseva², E.V. Kashtanova², Ya.V. Polonskaya², Yu.I. Ragino², E.V. Shakhtshneider^{1,2}

¹ Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademika Lavrentieva ave., 10

² Research Institute of Internal and Preventive Medicine –
Branch of the Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics SB RAS
630089, Novosibirsk, Borisa Bogatkova st., 175/1

Abstract

Understanding the molecular mechanisms of atherosclerotic vascular lesions formation is necessary both for assessing the risks of cardiovascular diseases and for finding approaches to their therapy. The task remains relevant, despite the large number of studies carried out, because there are differences in the factors of genetic predisposition to atherosclerosis and its complications between different ethno-territorial groups. The aim of this study was to search for genetic variants of pattern recognition receptors associated with lipid metabolism disorders that can lead to the development of coronary atherosclerosis (CA). **Material and methods.** Analysis of exons and adjacent splicing sites of pattern recognition receptors genes in patients with CA (30 men), and then genotyping of a population sample from Novosibirsk ($n = 1441$) by real-time PCR for selected rs113706342 of the *TLR1* gene and analysis of associations of its carriage with lipid metabolism were performed. **Results and discussion.** The frequency of the minor allele rs113706342 C of the *TLR1* gene in the sample of residents of Novosibirsk was 0.0114 ± 0.0062 , the carriage of this variant was associated with an increased level of low-density lipoprotein cholesterol in both women and men ($p = 0.009$ and $p = 0.019$, respectively). Women carriers of the minor allele C for rs113706342 also had a statistically significant increase in total serum cholesterol ($p = 0.013$) compared with TT homozygotes. To test the role of this variant in the development of CA, genotyping of an extended sample of patients is required. In one of the patients with CA, a previously undescribed single nucleotide variant chr16:3614637 G/C was found, leading to the Leu101Val substitution in the *NLRC3* gene; segregation analysis is required to assess its functional significance. **Conclusions.** The association of rs113706342 C of the *TLR1* gene with lipid metabolism disorders in the Russian population is shown.

Key words: coronary atherosclerosis, ischemic heart disease, next generation sequencing, pattern recognition receptors, single nucleotide variant, *TLR1* gene, *NLRC3* gene, rs113706342.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. This study was supported by Russian State Budget program FWNR-2022-0021.

Acknowledgements. DNA sequencing was performed using the technique of the Research Equipment Sharing Center “Proteomic Analysis” supported by the Russian Ministry of Education and Science (Agreement No. 075-15-2021-691).

Correspondence author: Mikhailova S.V., e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru

Citation: Mikhailova S.V., Ivanoshchuk D.E., Orlov P.S., Latyntseva L.D., Kashtanova E.V., Polonskaya Ya.V., Ragino Yu.I., Shakhtshneider E.V. Analysis of polymorphism of innate immunity receptor genes in patients with coronary atherosclerosis and in a population sample from Novosibirsk. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2023;43(4):97–109. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20230410

Введение

Атеросклероз коронарных сосудов является одной из основных причин ишемической болезни сердца (ИБС). Атеросклеротические бляшки перекрывают просвет артерий сердца, а также провоцируют тромбообразование, тем самым нарушая кровоснабжение сердечных мышц. Формирование бляшек начинается с накопления липопротеинов, особенно их окисленных форм, в артериальной стенке, это приводит к аккумуля-

ляции моноцитов, их дифференцировке в макрофаги и образованию в сосудистой стенке очагов воспаления, состоящих из пенистых клеток и волокон внеклеточного матрикса. На поздних стадиях происходит миграция в очаг гладкомышечных клеток и прорастание кровеносных сосудов в бляшку, внеклеточное отложение липидов и обызвествление [1]. Выявление молекулярных механизмов атерогенеза остается актуальной задачей в связи с высокой частотой сердечно-сосудистых

заболеваний (ССЗ) и их лидирующей роли среди причин смертности в развитых странах.

Среди генетических факторов предрасположенности к атеросклерозу выделяют варианты, ассоциированные с дислипидемиями, варианты генов ферментов окислительно-восстановительных реакций, регуляторов клеточного цикла, клеточной адгезии и миграции [2], а также генов врожденного иммунитета, отвечающих за индукцию воспалительной реакции, так как воспаление служит одной из патогенетических причин атеросклероза и его осложнений [3–6]. Сигнальный путь NF-κB является основным в регуляции генов воспалительного ответа (провоспалительных цитокинов, хемокинов, молекул адгезии), он опосредует выживание клеток, клеточную дифференцировку и пролиферацию, а также образование внеклеточного матрикса; показано его участие в патологических процессах большинства ССЗ [7–9]. Запуск этого сигнального каскада инициируется связыванием паттерн-распознающих рецепторов с их специфическими внеклеточными или внутриклеточными лигандами: компонентами клеточных стенок бактерий, оболочек вирусов, простейших и грибов, нуклеиновыми кислотами, кристаллами холестерина и другими сигналами инфекции либо нарушенного метаболизма собственных клеток.

Для нескольких классов белков врожденного иммунитета показана ассоциация с ожирением как на животных моделях, так и у человека [10]. В их число входит ряд паттерн-распознающих рецепторов (ППР): Toll-подобные рецепторы (TLR), их ко-рецептор CD14, NOD-подобные рецепторы (NLR), рецепторы свободных жирных кислот (FFAR) и цитозольный сенсор нуклеиновых кислот (LRRFIP1). Ожирение является независимым фактором риска развития атеросклероза, так как оно, с одной стороны, связано с изменением липидного профиля, а с другой – вызывает хронический воспалительный процесс в жировой ткани, который может влиять на воспалительные ответы организма в целом [11].

Рецепторы TLR1-9 после связывания с лигандами запускают сигнальные пути NF-κB и AP-1 [12]. Сведения о функциях TLR10 различаются, предполагается, что он является регуляторным [13]. У человека показана ассоциация нескольких однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОНВ) в генах *TLR2*, *4* и *5* с ожирением [10]. NLR – цитозольные ППР, которые индуцируют либо ингибируют врожденный иммунный ответ. Наиболее изучены белки, формирующие инфламасому и приводящие к активации провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-18 и последующему разрушению клетки путем пироптоза [14]. Для одного из них, NLRP3 (NOD-like receptor protein 3), показана активация сигнального пути

NF-κB после связывания окисленных форм липидов [15]. NLRC3 (NLR family CARD domain-containing 3) – один из регуляторных NLR, ингибирующий сигнальный путь NF-κB [16]. Для rs758747 в гене *NLRC3* показана ассоциация с ожирением, а для rs10754558 гена *NLRP3* – протективный эффект против него [10]. LRRFIP1 (LRR-binding FLN-interacting protein 1) – цитозольный сенсор нуклеиновых кислот. Его связывание с лигандами индуцирует синтез интерферона типа 1 и провоспалительных цитокинов посредством активации NF-κB [17]. Для восьми ОНВ гена *LRRFIP1* показана ассоциация с ожирением [18]. Рецепторы жирных кислот экспрессируются макрофагами и адипоцитами и модулируют иммунный ответ. FFAR4 ингибирует провоспалительные сигнальные пути NF-κB и JNK [19]. ОНВ rs116454156 этого гена связан с повышенным риском ожирения [20].

Таким образом, ряд ППР может оказывать влияние одновременно на два фактора риска развития атеросклероза – ожирение и воспаление, что повышает вероятность обнаружить в этих генах варианты, ассоциированные с ИБС. Для многих вышеупомянутых ОНВ в паттерн-распознающих рецепторах найденная связь с ожирением этноспецифична. Генетические факторы, определяющие повышенный риск развития ССЗ в целом, также этноспецифичны, например, набор ОНВ, ассоциированных с изменением уровня липопротеинов, различается в популяциях разного происхождения [21]. Поэтому актуальны независимые исследования связей между генетическими вариантами и отдельными факторами риска ССЗ и в целом с этими заболеваниями для различных этнотерриториальных групп.

В данном исследовании проанализированы последовательности некоторых ППР и их адаптерных белков в полноэкзомных сиквенсах 30 пациентов мужского пола из г. Новосибирска с коронарным атеросклерозом, в результате чего для дальнейшего анализа был отобран rs113706342 гена *TLR1*.

Материал и методы

Пациенты с коронарным атеросклерозом

Образцы венозной крови получены от пациентов ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России. Исследование проведено в рамках Программы совместных научно-исследовательских работ НИИ терапии и профилактической медицины – филиала ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (НИИТГПМ – филиал ИЦиГ СО РАН) (научный руководитель работы – д.м.н., чл.-корр. РАН Ю.И. Рагино) и ФГБУ

НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России (научный руководитель работы – д.м.н., проф. А.М. Чернявский). В исследование, на участие в котором получено информированное согласие у всех обследованных, включены 30 мужчин 40–70 лет (возраст $53,0 \pm 3,8$ года; 97 % европеоидов) с коронароангиографически верифицированным коронарным атеросклерозом, без острого коронарного синдрома, со стабильной стенокардией напряжения II–IV ФК. Длительность ИБС составляла от 1 до 20 лет, индекс массы тела – $30,5 \pm 2,2$ кг/м², все пациенты получали липид-снижающую терапию препаратами группы статинов. Пациенты поступали в клинику ФГБУ НМИЦ им. академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России на операцию коронарного шунтирования из разных населенных пунктов Сибири и Дальнего Востока, для каждого из них заполнен протокол исследования и выполнен забор крови. Критериями исключения пациентов из исследования были инфаркт миокарда давностью менее 6 месяцев, острые воспалительные заболевания, обострение хронических воспалительных заболеваний, активные заболевания печени, почечная недостаточность, онкологические заболевания.

Популяционная выборка жителей г. Новосибирска

В Новосибирске (Западная Сибирь, Россия) ранее выполнено одномоментное эпидемиологическое исследование взрослого населения. Из жителей Новосибирска, обследованных в 2007–2008 гг. в рамках проекта «Здоровье, алкоголь и психосоциальные факторы в Восточной Европе» (НАРИЕЕ) [22], с помощью таблицы случайных чисел сформирована основная репрезентативная выборка (9360 человек в возрасте 45–69 лет, средний возраст $53,8 \pm 7,0$ года, 95 % европеоидного происхождения). Протокол исследования одобрен этическим комитетом НИИТПМ – филиала ИЦиГ СО РАН (разрешение № 7 от 22 июня 2008 г.). Каждый участник дал письменное информированное согласие на обследование и забор крови. Программа диспансеризации включала в себя сбор социально-демографических данных, диспансеризацию, стандартный опрос о табакокурении, антропометрические измерения (рост, масса тела, окружность талии), измерение артериального давления, определение биохимических показателей в сыворотке крови (содержание общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой (ХС ЛПНП) и высокой (ХС ЛПВП) плотности, триглицеридов и глюкозы натощак). Кровь забирали из срединной локтевой вены утром после 12-часового ночного голодания. Параметры липидного профиля крови определяли фермента-

тивным методом с использованием стандартных наборов (Biocon Fluitest, Германия) на биохимическом анализаторе FP-901 (Labsystem, Финляндия). Для проведения молекулярно-генетического анализа из основной репрезентативной выборки методом случайных чисел отобран 1441 человек (692 мужчины, 749 женщин).

Популяционная выборка народности алтай-кижи (южные алтайцы)

В работе использовалась случайная выборка коренных жителей Республики Горный Алтай азиатского происхождения, состоящая из 83 человек, собранная в НИИТПМ – филиале ИЦиГ СО РАН. Критерии включения: наличие письменного информированного согласия обследуемых, наличие алтайцев в родословной в трех поколениях по материнской линии и не менее чем в одном поколении по отцовской линии. Для полноэкзомного секвенирования случайным образом отобраны 18 человек (8 мужчин, 10 женщин, возраст 20–66 лет, средний возраст 53 года). ИБС по данным клинического обследования выявлена у трех женщин 58, 59 и 60 лет.

Выделение ДНК

ДНК выделяли из венозной крови методом фенол-хлороформной экстракции [23]. Количество и качество ДНК оценивали на спектрофотометре для микропланшетов Epoch (BioTek, США).

Приготовление библиотек и полноэкзомное секвенирование

Секвенирование ДНК группы алтайцев проводили на платформе Ion GeneStudio S5 Systems (все приборы и реагенты производства Thermo Fisher Scientific, США) с использованием чипа Ion 540. Библиотеки подготовлены с использованием системы Ion Chef в соответствии с инструкциями производителя из 50 нг ДНК на образец с использованием наборов Ion AmpliSeq™ Exome RDY Kit 1x8 и Ion AmpliSeq™ Library Kit Plus. Для создания библиотек секвенирования использовали набор адаптеров Ion Xpress™ Barcode Adapters 1-16 Kit. Количественную оценку библиотек проводили на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System с использованием набора Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit. Клональную амплификацию библиотек выполняли методом эмульсионной ПЦР с последующим нанесением подготовленных библиотек на чип с использованием набора Ion 540 kit–Chef Kit. Биоинформатический анализ полученных данных проведен с использованием программного обеспечения Ion Reporter v.5.6 после выравнивания с эталонным геномом человека версии GRCh37(hg19).

Секвенирование экзома пациентов с ИБС выполняли на 50 нг ДНК с использованием протокола целевого обогащения мишеней SureSelect QXT для библиотек мультиплексного секвенирования Illumina с парными концами (Agilent Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя. Приготовление библиотек проводили с помощью набора SureSelect Exome V6+UTR (Agilent Technologies). Полученные библиотеки секвенировали на платформе NextSeq-500 (Illumina, США), данные выравнивали на референсный геном человека GRCh37(hg19) с использованием программного обеспечения Burrow–Wheeler Alignment tool (BWA v.0.7.17) (режим доступа: <http://bio-bwa.sourceforge.net/>). Последующий биоинформационный анализ включал удаление ПЦР-дубликатов, поиск ОНВ с помощью Genome Analysis Toolkit v.3.3 (режим доступа: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>) и их аннотацию с использованием программы ANNOVAR (режим доступа: <https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>). Также использовали данные баз gnomAD (режим доступа: <https://gnomad.broadinstitute.org/>), версия 2.1.1 (для европейцев не финского происхождения) и ClinVar (режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>).

Анализ полиморфных сайтов

Для анализа найденных вариантов использовали существующие данные о клинической значимости аннотированных ОНВ (Лейденская открытая база данных вариаций (режим доступа: <https://www.lovd.nl/>), ClinVar (режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)) и литературные данные. Возможные функциональные и значимые эффекты ОНВ оценивали с помощью инструментов прогнозирования *in silico* (SIFT (режим доступа: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), PolyPhen2 (режим доступа: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), PROVEAN (режим доступа: <https://www.jcvi.org/research/provean>), MutationTaster (режим доступа: <https://www.mutationtaster.org/>), SpliceAI (режим доступа: <https://spliceailookup.broadinstitute.org/>)), а также данных о частотах этих вариантов в популяции согласно gnomAD и RUSeq (режим доступа: <http://ruseq.ru/#/>). Варианты, описанные в ClinVar или предсказанные *in silico* как доброкачественные или вероятные доброкачественные, а также варианты с частотой минорных аллелей выше 0,05 согласно базам данных, из дальнейшего анализа исключали.

Анализ распространенности аллелей и генотипов по rs113706342

Анализ проводили в выборке населения г. Новосибирска с использованием технологии

TaqMan. Амплификацию участка геномной ДНК, которая содержала изучаемый вариант, выполняли методом ПЦР в режиме реального времени на приборе LightCycler® 96 Instrument (Roche Diagnostics, Швейцария). Фланкирующие олигонуклеотиды и TaqMan-зонды подбирали с помощью программы Primer-Blast (режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Подобранные следующие фланкирующие олигонуклеотиды и комплементарные зонды, меченные красителями FAM, HEX, и гаситель флуоресценции BHQ1:

rs113706342-F-5'-
TCCAGCAAGATCAGGATTAAGC-3',
rs113706342-R-5'-
GAATGGTGCCATTATGAACTCTAC-3',
rs113706342-5'-[FAM]TTGCCCATCACAATCTC-
TTTCATGA[BHQ1]-3',
rs113706342-5'-[HEX]TTGCCCATCACAATCTC-
TTTCCTGA[BHQ1]-3'.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 25 мкл с использованием 15 нг ДНК, по 100 нМ прямого и обратного фланкирующих праймеров, 50 нМ каждого из двух зондов и мастер микса BioMaster HS-qPCR Hi-ROX (2×) (Биолабмикс, Россия) согласно протоколу производителя. Режим амплификации начинался со 180 с при 95 °С, затем 40 циклов: 95 °С – 30 с, 60 °С – 60 с.

Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *NLRC3*, содержащего ранее не описанный вариант chr16:3614637 G/C, проводили с использованием праймеров 5'-CTCTGTCCCGCAGACTCAAG-3' и 5'-TCCTTCTTTGGGTCCGTGC-3' (дизайн олигонуклеотидов выполнен в программе Primer-Blast, режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) на приборе ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) с помощью набора BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific). Последовательности анализировали в программе Vector NTI® Advance (Thermo Fisher Scientific). Версия hg19 человеческого генома служила референсной последовательностью для выравнивания.

Статистический анализ

Статистическую значимость различий частот аллелей между исследуемыми подгруппами и соответствие равновесию Харди – Вайнберга определяли с помощью критерия χ^2 . Для всех количественных показателей выполнена проверка на нормальность распределения с помощью теста Колмогорова – Смирнова. Оценку различий средних непрерывных переменных между раз-

личными генотипами проводили после поправки на пол, возраст и индекс массы тела с помощью обобщенной линейной модели в программе SPSS для Windows.

Результаты

В данных полноэкзомного секвенирования пациентов с коронарным атеросклерозом проанализированы миссенс-варианты, варианты, приводящие к появлению сайта преждевременной терминации трансляции и к сдвигу рамки считывания в генах, кодирующих ряд рецепторов врожденного иммунитета (Toll-подобные рецепторы: TLR1-10; NOD-подобные рецепторы: NLRP, NLRC, NAIP; рецепторы свободных жирных кислот FFAR2 и FFAR4; цитозольный сенсор нуклеиновых кислот LRRFIP1), для которых показана ассоциация с ожирением, а также адаптерных белков этих рецепторов (TIRAP, TRAM, TRIF, MyD88). Для дальнейшего анализа отобраны генетические варианты, которые встречались среди европеоидов не финского происхождения согласно базе данных gnomAD (версия 2.1.1) с частотой

не более 0,05, а также более распространенные варианты, для которых ранее показана ассоциация с ожирением или ССЗ. В результате выявлены ОНВ в экзонах генов Toll-подобных рецепторов *TLR1*, *TLR2*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6* и *TLR10*, NOD-подобных рецепторов *NLRC3* и *NLRP3*, рецептора свободных жирных кислот *FFAR4* (*GPR120*), сенсора нуклеиновых кислот *LRRFIP1* и гена, кодирующего адаптерный белок TIRAP, передающий сигнал с TLR1, TLR2, TLR4 и TLR6. В исследованной выборке у 11 пациентов обнаружены генетические варианты, для которых ранее показана ассоциация с ожирением и ССЗ в различных популяциях: rs116454156 гена *FFAR4* [20], ко-сегрегирующие варианты rs4986790+rs4986791 гена *TLR4* [24], rs5743708 гена *TLR2* [25], rs11680012 и rs3213869 гена *LRRFIP1* [18, 26], а также rs35829419 гена *NLRP3* [27]. Для rs5744168, встретившейся у двух пациентов в сочетании с rs45528236 в гене *TLR5*, ранее обнаружено протективное действие в отношении ожирения [28]. Обнаруженные генетические варианты, отобранные согласно вышеописанным критериям, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Обнаруженные ОНВ, их частота у пациентов с коронарным атеросклерозом и в базе данных gnomAD (v2.1.1), ассоциации с клиническим фенотипом и/или данные функциональных исследований согласно данным литературы

Table 1. Detected single nucleotide variants, their frequency among patients with coronary atherosclerosis and in the gnomAD (v2.1.1) database, associations with the clinical phenotype and/or data from functional studies according to the literature (n – number of alleles found)

| Ген | ОНВ | (Транскрипт) замена в кДНК (белковая последовательность) замена аминокислоты | n | Частота аллеля у пациентов | Частота аллеля в gnomAd (v2.1.1) | Ассоциации с клиническим фенотипом, данные функциональных исследований |
|-------------|-------------|--|---|----------------------------|----------------------------------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| <i>TLR1</i> | rs113706342 | (NM_003263.4) c.2159A>C (NP_003254.2) p.His720Pro | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,009189 | <i>In vitro</i> сниженная активация NF-κB [29] |
| | rs76600635 | (NM_003263.4) c.130T>C (NP_003254.2) p.Ser44Pro | 3 | 0,05 ± 0,028 | 0,0005204 | |
| | rs150138583 | (NM_003263.4) c.893C>T (NP_003254.2) p.Ser298Phe | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,001299 | |
| | rs756776247 | (NM_003263.4) c.2104_2105dup (NP_003254.2) p. Gln703SerfsTer25 | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,0004259 | |
| | rs3923647 | (NM_003263.4) c.914A>T (NP_003254.2) p. His305Leu | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,03084 | <i>In vitro</i> повышенный уровень IL-6 в ответ на стимуляцию [30] |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------|--------------------------|--|---|---|----------------------|--|
| TLR1 | rs145135062 | (NM_003263.4) c.171A>G (NP_003254.2) p.Ile57Met | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,004541 | |
| | rs770320905 | (NM_003263.4) c.1184C>T (NP_003254.2) p.Thr395 Ile | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,00006219 | |
| TLR2 | rs5743704 | (NM_001318789.2) (c.1892C>A) (NP_001305718.1) p. Pro631His | 3 | 0,050 ± 0,028 | 0,03944 | <i>In vitro</i> снижен- ная активация NF-κB [29] |
| | rs5743708 | (NM_001318789.2) (c.2258G>A) (NP_001305718.1) p. Arg753Gln | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,02896 | Ожирение [25], <i>in vitro</i> снижен- ная активация NF-κB [29] |
| | rs150388453 | (NM_001318789.2) (c.798G>C) (NP_001305718.1) p. Leu266Phe | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,001672 | |
| | rs61735278 | (NM_001318789.2) (c.2186A>G) (NP_001305718.1) p. Asn729Ser | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,0002634 | |
| TLR4 | rs4986790, rs4986791 | (NM_138554.5) (c.896A>G) (NP_612564.1) p. Asp299Gly; (NM_138554.5) (c.1196C>T) (NP_612564.1) p. Thr399Ile | 5 | 0,100 ± 0,039 rs4986790; 0,083 ± 0,036 rs4986791 | 0,05575 + 0,05863 | Ожирение [24] |
| | rs4986790 | | 1 | | | <i>In vitro</i> снижен- ная активация NF-κB [31] |
| TLR5 | rs764535 | (NM_003268.6) (c.245C>T) (NP_003259.2) p. Thr82Ile | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,006762 | |
| | rs5744168, rs45528236 | (NM_003268.6) (c.1174C>T) (NP_003259.2) p. Arg392Ter (NM_003268.6) (c.541C>A) (NP_003259.2) p. Gln181Lys | 3 | 0,050 ± 0,028 | 0,06090 0,06085 | Протективный эффект в отно- шении ожире- ния [28] |
| TLR6 | rs3796508, rs5743808 | (NM_006068.5) (c.2249A>G) (NP_006059.2) p. Val327Met | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,002589 | |
| | | (NM_006068.5) (c.359T>C) (NP_006059.2) p. Ile120Thr | | | 0,002866 | |
| TLR10 | rs765764230 | (NM_030956.4) (c.2249A>G) (NP_112218.2) p. Glu750Gly | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,00001550 | |

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|----------------|---|---|---------------|---------------|----------|-----------------------|
| <i>TLR10</i> | rs138645932 | (NM_030956.4) (c.287A>G) (NP_112218.2) p. Lys96Arg | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,006537 | |
| | rs11466658 | (NM_030956.4) (c.1573C>A) (NP_112218.2) p. Arg525Trp | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,03127 | |
| | rs11466653, rs11466651, rs11466649 | (NM_030956.4) (c.359T>C) (NP_112218.2) p. Met326Thr, | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,03173 | |
| | | (NM_030956.4) (c.892G>A) (NP_112218.2) p. Val298Ile | | | 0,03210 | |
| | | (NM_030956.4) (c.487G>T) (NP_112218.2) p. Ala163Ser | | | 0,03257 | |
| rs4129008 | (NM_030956.4) (c.2396G>A) (NP_112218.2) p. Arg799Gln | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,005224 | | |
| <i>LRRFIP1</i> | rs11680012 | (NM_001137550.2) (c.1394A>G) (NP_001131022.1) p. Arg690Thr | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,04583 | Ожирение [18] |
| | rs201910589 | (NM_001137550.2) (c.488G>T) (NP_001131022.1) p. Arg163Leu | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,01285 | |
| | rs3213869 | (NM_001137550.2) (c.1394A>G) (NP_001131022.1) p. Gln275Arg | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,04565 | Инфаркт миокарда [26] |
| <i>FFAR4</i> | rs116454156 | (NM_001195755.2) (c.761G>A) (NP_001182684.1) p. Arg270His | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,02054 | Ожирение [20] |
| <i>NLRC3</i> | rs74760019 | (NM_178844.4) (c.2785G>A) (NP_849172.2) p. Ala975Thr | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,01778 | |
| <i>NLRC3</i> | Новая | (NM_178844.4) (c.724C>G) (NP_849172.2) p. Leu101Val | 1 | | – | |
| <i>NLRP3</i> | rs35829419 | (NM_001243133.2) (c.2107C>A) (NP_001230062.1) p. Gln705Lys | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,05100 | ИБС [27] |
| <i>TIRAP</i> | rs8177399 | (NM_001318777.2) (c.37C>T) (NP_001305706.1) p.Arg13Trp | 1 | 0,017 ± 0,017 | 0,01965 | |
| | rs3802813 | (NM_001318777.2) (c.164G>A) (NP_001305706.1) p. Ser55Asn | 2 | 0,033 ± 0,023 | 0,04154 | |

Примечание: n – число найденных аллелей.

Помимо вышеуказанных вариантов с доказанной ассоциацией с заболеваниями, для трех ОНВ в генах *TLR1* и *TLR2* показаны снижение активации сигнального пути NF-κB и повышенная экспрессия IL-6 в ответ на стимуляцию *in vitro* [29, 30] (см. табл. 1). Редкие варианты (частота менее 0,005 в популяции) – rs150138583, rs756776247 и rs145135062 гена *TLR1*, rs61735278 гена *TLR2* и rs3796508+ rs5743808- гена *TLR6* были обнаружены в выборке однократно. ОНВ rs4986790 гена *TLR4*, для которого показана ассоциация с ожирением в сочетании с rs4986791 и функциональная значимость *in vitro*, при этом данные о связи с ССЗ и атеросклерозом противоречивы [24, 30, 32–35], встретился в выборке пациентов с ИБС с частотой $0,100 \pm 0,039$, которая превышала частоту, описанную в gnomAD (0,05575). Однако данные RUSeq о частоте этого ОНВ в разных регионах России различаются (0,0452–0,0825). Два полиморфных варианта гена *TLR1* имели повышенную частоту в обследованной выборке: встретившиеся трижды rs76600635 (гомозигота и гетерозигота) и rs113706342 (встретившаяся оба раза вместе с rs11466653, rs11466651 и rs11466649 гена *TLR10*, лежащего в том же генном кластере). Первая из вышеупомянутых замен была предсказана как нейтральная, а для второй, расположенной в TIR-домене белка, ранее показана функциональная значимость *in vitro* на линии человеческих эмбриональных клеток почки НЕК 293Т [29]. При этом частота минорного аллеля rs76600635 повышена (0,1017) в восточно-азиатских популяциях относительно европеоидных (gnomAD).

С целью оценки частоты rs76600635 в соседних с г. Новосибирском азиатских популяциях

проанализированы результаты полноэкзомного сиквенса 18 представителей народности алтай-кижи. Замена в этом сайте найдена трижды ($0,083 \pm 0,046$), что подтвердило ее высокую распространенность в Азии. При этом минорный аллель по rs76600635 обнаружен у двух женщин (в гомо- и гетерозиготном состоянии) из трех с диагнозом ИБС в данной выборке. Во всех трех случаях этот ОНВ встретился вместе с вариантом rs4833095, как было ранее показано в китайских выборках [36]. Частота rs113706342, напротив, снижена во всех азиатских популяциях относительно европеоидных (gnomAD), поэтому ее повышение в выборке пациентов относительно частот в базах данных gnomAD и RUSeq не могло быть связано с метисацией.

С целью оценки ассоциации rs113706342 с показателями липидного обмена выполнен анализ частоты этого ОНВ в выборке населения г. Новосибирска ($n = 1441$). Частота минорного аллеля в популяционной выборке у мужчин и женщин статистически значимо не различалась ($p = 0,487$, $\chi^2 = 0,569$) и составила $0,0114 \pm 0,0062$. Результаты сравнения содержания общего холестерина сыворотки, холестерина липопротеинов высокой и низкой плотности, а также триглицеридов (ковариаты: пол, индекс массы тела, возраст) у носителей разных генотипов по rs113706342 представлены в табл. 2.

Носительницы минорного аллеля С по rs113706342 гена *TLR1* имели статистически значимое повышение содержания общего холестерина сыворотки ($p = 0,013$) и ХС ЛПНП ($p = 0,009$) по сравнению с гомозиготами ТТ. При этом у мужчин наблюдалась статистически значимая ас-

Таблица 2. Содержание липидов в сыворотке крови жителей г. Новосибирска в зависимости от генотипа по rs113706342 гена *TLR1*

Table 1. Level of total serum cholesterol, triglyceride, high and low density lipoprotein cholesterol depending on the rs113706342 genotype of the *TLR1* gene in the population sample of Novosibirsk

| Генотип (число носителей) | Содержание общего холестерина, мг/дл | Содержание триглицеридов, мг/дл | Содержание ХС ЛПВП, мг/дл | Содержание ХС ЛПНП, мг/дл |
|---------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Мужчины (n) | | | | |
| ТТ (674) | 248,5 ± 58,1 | 145 ± 86,6 | 59,1 ± 15,7 | 124,1 ± 50,4 |
| ТС (18) | 249,6 ± 71,3 | 132,3 ± 66,8 | 59,7 ± 11,5 | 130,4 ± 55,3 |
| p | 0,269 | 0,173 | 0,354 | 0,019 |
| Женщины (n) | | | | |
| ТТ (734) | 268,4 ± 65,5 | 147,9 ± 91,8 | 61,9 ± 14,6 | 139,7 ± 53,0 |
| ТС (15) | 307,5 ± 93,9 | 156,1 ± 73,9 | 63,9 ± 14,3 | 173,3 ± 80,1 |
| p | 0,013 | 0,685 | 0,597 | 0,009 |
| В целом (n) | | | | |
| ТТ (1408) | 258,9 ± 62,8 | 146,5 ± 89,5 | 60,6 ± 15,2 | 132,2 ± 52,3 |
| ТС (33) | 275,9 ± 87,1 | 143,1 ± 70,0 | 61,6 ± 12,8 | 149,9 ± 70,0 |
| p | 0,073 | 0,752 | 0,554 | 0,026 |

социация носительства аллеля С с концентрацией ХС ЛПНП ($p = 0,019$), в суммарной выборке статистическая значимость сохранялась для ХС ЛПНП ($p = 0,026$).

У одного пациента с коронарным атеросклерозом обнаружена ранее не описанная мутация в гене NOD-подобного рецептора *NLRC3* chr16:3614637 G/C (NM_178844.4 c.724C>G), приводящая к замене Leu101Val (см. табл.1). Наличие данного полиморфного сайта подтверждено секвенированием по Сэнгеру (рисунок).

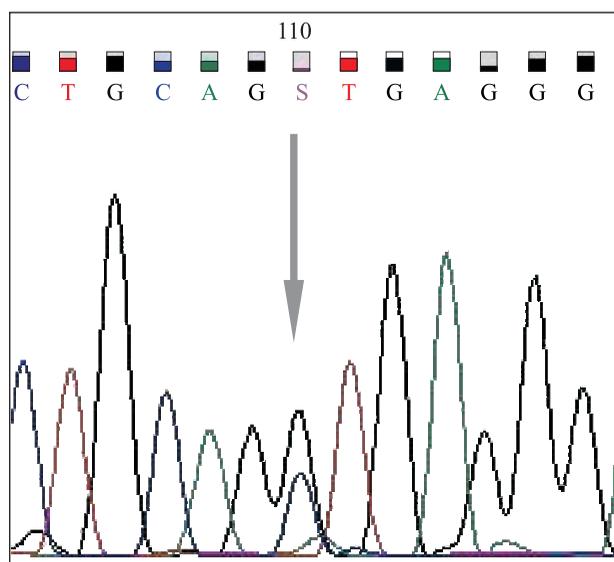
При оценке потенциальной значимости данная замена была определена как нейтральная с коэффициентами 0,104 в PolyPhen2, 32 в MutationTaster, -0,175 в PROVEAN и 0,22 в SIFT. SpliceAI не показал влияния данной замены на сплайсинг.

Обсуждение

В фокусе данного исследования находились гены врожденного иммунитета, кодирующие ПРР и их адаптерные белки. Было предположено, что вероятность обнаружить ассоциацию с атеросклерозом выше среди генов ПРР, для которых существует ассоциация с ожирением, так как ожирение и нарушение воспалительного ответа являются независимыми факторами риска развития ИБС. Показано, что многие хронические инфекции, включая вызванные *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, а также вирусами гепатита С, Эпштейна – Барр, ВИЧ, герпеса типа 1 и 2, цитомегаловирусом, могут провоци-

ровать развитие атеросклероза [37]. Кроме этого воспалительная реакция, наблюдаемая при ожирении, определяет вероятность развития его осложнений, в том числе атеросклероза и сахарного диабета типа 2 [9, 38]. В результате в экзонах 30 пациентов с коронарным атеросклерозом найдено шесть вариантов в генах ПРР, предрасполагающих, согласно литературным данным, к ожирению, инфаркту миокарда и ИБС, а также два протективных ОНВ, однако различий в их частотах между обследованной выборкой и популяционными данными не найдено. Возможно, это связано с тем, что влияние данных мутаций на вероятность развития атеросклероза и ИБС относительно невелико и становится заметным на больших по размеру выборках [2]. Нами выявлены два ОНВ гена *TLR1*, частота которых была повышена в выборке пациентов с коронарным атеросклерозом относительно описанной в базах данных для европеоидного населения. Для этого гена ранее не обнаружена связь с ожирением у человека, однако экспрессия гена *TLR1* повышена в адипоцитах мышей с индуцированным диетой ожирением [39] и в атеросклеротических бляшках у человека [40]. Для ОНВ rs5743551, расположенного в зоне до 2000 н.п. от 5'-конца гена *TLR1*, показана ассоциация со сниженным риском ИБС (отношение шансов 0,41, 95%-й доверительный интервал 0,14–0,82) в российской популяции [41].

Редкий вариант rs76600635 С в гене *TLR1* встретился в исследованной выборке трижды при частоте у европейцев 0,0005 согласно gnomAD. Обусловленная им замена серина на пролин в позиции 44 соответствующего белка предсказана *in silico* как нейтральная, однако в некоторых азиатских популяциях показано расположение rs76600635 в гаплотипическом блоке с вариантами, определяющими предрасположенность к туберкулезу и побочным реакциям на препараты против него [36, 42], а также ассоциация минорного варианта rs76600635 с повышенной смертностью от миелоидоза среди тайцев [43]. Частота варианта rs76600635 С существенно выше в Восточной Азии (0,1017), поэтому ее увеличение среди пациентов могло быть связано с азиатским происхождением предков, носителей этого варианта, в исследованной нами выборке. Оценка частоты его встречаемости в выборке жителей центрально-азиатской популяции алтай-кижи также показала повышенную относительно европейцев частоту минорного варианта rs76600635, что может говорить о ее более высокой частоте относительно европейской и в Центральной Азии. Для оценки возможной роли rs76600635 гена *TLR1* в патогенезе атеросклероза требуется его гаплотипический анализ в российской популяции, а так-



Электрофореграмма участка ДНК гена *NLRC3*, содержащего ранее не описанный вариант chr16:3614637 G/C

Electrophoregram of a DNA region of the *NLRC3* gene containing a previously undescribed variant chr16:3614637 G/C

же генотипирование расширенной выборки пациентов с ИБС азиатского происхождения. Еще один вариант гена *TLR1*, частота которого была повышена ($0,033 \pm 0,023$) среди пациентов с ИБС относительно данных gnomAD, – rs113706342. В исследованной нами выборке населения г. Новосибирска его частота составила $0,0114 \pm 0,0062$. Минорный аллель этого ОНВ определяет аминокислотную замену His720Pro в TIR-домене белка, который отвечает за связывание белков TLR между собой при образовании димеров и с адаптерными белками для передачи сигнала. В результате исследования ассоциации генотипов по этому ОНВ с показателями липидного обмена в популяционной выборке г. Новосибирска выявлена статистически значимая ассоциация минорного аллеля С с уровнем ХС ЛПНП у мужчин ($p = 0,019$) и женщин ($p = 0,009$), при этом у женщин он также был связан с увеличением уровня ОХС ($p = 0,013$). Это может свидетельствовать о вкладе rs113706342 в предрасположенность к атеросклерозу и ИБС в европеоидных популяциях Севера Евразии, где его частота выше, чем в Европейской части.

Найденный нами ранее не описанный вариант в гене *NLRC3*, вызывающий замену аминокислоты Leu101Val, был оценен *in silico* как нейтральный, однако для его полного описания требуется проведение сегрегационного анализа.

Заключение

Нами выявлена ассоциация минорного варианта rs113706342 С гена *TLR1* с повышенным уровнем ХС ЛПНП ($p = 0,026$) в выборке населения г. Новосибирска, а у женщин из этой выборки – также с содержанием общего холестерина сыворотки крови ($p = 0,009$), оба показателя являются факторами риска развития атеросклероза. Для оценки вклада данного ОНВ в заболеваемость ИБС требуется исследование расширенной выборки пациентов.

Список литературы / References

1. Baker R.G., Hayden M.S., Ghosh S. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. *Cell. Metab.* 2011;13(1):11–22. doi: 10.1016/j.cmet.2010.12.008
2. Tibaut M., Caprnda M., Kubatka P., Sinkovič A., Valentova V., Filipova S., Gazdikova K., Gaspar L., Mozos I., Egom E.E., ... Petrovic D. Markers of atherosclerosis: Part 2 – Genetic and imaging markers. *Heart. Lung. Circ.* 2019;28(5):678–689. doi: 10.1016/j.hlc.2018.09.006
3. Forgo B., Medda E., Hernyes A., Szalontai L., Tarnoki D.L., Tarnoki A.D. Carotid artery atherosclerosis: a review on heritability and genetics. *Twin*

Res. Hum. Genet. 2018;21(5):333–346. doi: 10.1017/thg.2018.45

4. Posadas-Sánchez R., Vargas-Alarcón G. Innate immunity in coronary disease. The role of Interleukin-12 cytokine family in atherosclerosis. *Rev. Invest. Clin.* 2018;70(1):5–17. doi: 10.24875/RIC.17002335

5. Chyu K.Y., Dimayuga P.C., Shah P.K. Immunogenetics of atherosclerosis-link between lipids, immunity, and genes. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2020;22(10):53. doi: 10.1007/s11883-020-00874-4

6. Jaén R.I., Val-Blasco A., Prieto P., Gil-Fernández M., Smani T., López-Sendón J.L., Delgado C., Boscá L., Fernández-Velasco M. Innate immune receptors, key actors in cardiovascular diseases. *JACC Basic Transl. Sci.* 2020;5(7):735–749. doi: 10.1016/j.jacbps.2020.03.015

7. Fiordelisi A., Iaccarino G., Morisco C., Coscioni E., Sorriento D. NF κ B is a key player in the crosstalk between inflammation and cardiovascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(7):1599. doi: 10.3390/ijms20071599

8. Cheng W., Cui C., Liu G., Ye C., Shao F., Bagchi A.K., Mehta J.L., Wang X. NF- κ B, a potential therapeutic target in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2022. doi: 10.1007/s10557-022-07362-8

9. Hernandez R., Zhou C. Recent advances in understanding the role of IKK β in cardiometabolic diseases. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021;8:752337. doi: 10.3389/fcvm.2021.752337

10. Mikhailova S.V., Ivanoshchuk D.E. Innate-immunity genes in obesity. *J. Pers. Med.* 2021;11(11):1201. doi: 10.3390/jpm11111201

11. Hotamisligil G.S. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature.* 2017;542(7640):177–185. doi: 10.1038/nature21363

12. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010;11(5):373–384. doi: 10.1038/ni.1863

13. Fore F., Budipranama M., Destiawan R.A. TLR10 and its role in immunity. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2022;276:161–174. doi: 10.1007/164_2021_541

14. Coutermarsh-Ott S., Eden K., Allen I.C. Beyond the inflammasome: Regulatory NOD-like receptor modulation of the host immune response following virus exposure. *J. Gen. Virol.* 2016;97:825–838. doi: 10.1099/jgv.0.000401

15. Barra N.G., Henriksbo B.D., Anhê F.F., Schertzer J.D. The NLRP3 inflammasome regulates adipose tissue metabolism. *Biochem. J.* 2020;477(6):1089–1107. doi: 10.1042/BCJ20190472

16. Lupfer C., Kanneganti T.D. Unsolved mysteries in NLR biology. *Front. Immunol.* 2013;4:285. doi: 10.3389/fimmu.2013.00285

17. Takimoto M. Multidisciplinary roles of LR-FIP1/GCF2 in human biological systems and diseases. *Cells.* 2019;8:108. doi: 10.3390/cells8020108

18. Plourde M., Vohl M.C., Bellis C., Carless M., Dyer T., Dolley G., Marette A., Després J.P., Bouchard C., Blangero J., Pérusse L. A variant in the LR-RFIP1 gene is associated with adiposity and inflammation. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(1):185–192. doi: 10.1002/oby.20242
19. Kimura I., Ichimura A., Ohue-Kitano R., Igarashi M. Free fatty acid receptors in health and disease. *Physiol. Rev.* 2020;100(1):171–210. doi: 10.1152/physrev.00041.2018
20. Ichimura A., Hirasawa A., Poulain-Godefroy O., Bonnefond A., Hara T., Yengo L., Kimura I., Leloire A., Liu N., Iida K., ... Froguel P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012;483(7389):350–354. doi: 10.1038/nature10798
21. Wang Z., Manichukal A., Goff D.C. Jr., Mora S., Ordovas J.M., Pajewski N.M., Post W.S., Rotter J.I., Sale M.M., Santorico S.A., ... Frazier-Wood A.C. Genetic associations with lipoprotein subfraction measures differ by ethnicity in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Hum. Genet.* 2017;136(6):715–726. doi: 10.1007/s00439-017-1782-y
22. Peasey A., Bobak M., Kubinova R., Malyutina S., Pajak A., Tamosiunas A., Pikhart H., Nicholson A., Marmot M. Determinants of cardiovascular disease and other non-communicable diseases in Central and Eastern Europe: rationale and design of the HAPIEE study. *BMC Public Health*. 2006;6:255. doi: 10.1186/1471-2458-6-255
23. Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* 2006;2006(1):pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
24. Weyrich P., Staiger H., Stančáková A., Machicao F., Machann J., Schick F., Stefan N., Kuusisto J., Laakso M., Schäfer S., Fritsche A., Häring H.U. The D299G/T399I Toll-like receptor 4 variant associates with body and liver fat: results from the TULIP and METSIM Studies. *PLoS One*. 2010;5(11):e13980. doi: 10.1371/journal.pone.0013980
25. Soydas T., Karaman O., Arkan H., Yenmis G., Ilhan M.M., Tombulturk K., Tasan E., Kanigur Sultuybek G. The correlation of increased CRP levels with NFKB1 and TLR2 polymorphisms in the case of morbid obesity. *Scand. J. Immunol.* 2016;84(5):278–283. doi: 10.1111/sji.12471
26. Goodall A.H., Burns P., Salles I., Macaulay I.C., Jones C.I., Ardissino D., de Bono B., Bray S.L., Deckmyn H., Dudbridge F., ... Bloodomics Consortium. Transcription profiling in human platelets reveals LRRFIP1 as a novel protein regulating platelet function. *Blood*. 2010;116(22):4646–4656. doi: 10.1182/blood-2010-04-280925
27. Zhou D., Wang X., Chen T., Wen W., Liu Y., Wu Y., Yuan Z. The NLRP3 rs10754558 polymorphism is associated with the occurrence and prognosis of coronary artery disease in the Chinese han population. *Biomed. Res. Int.* 2016;2016:3185397. doi: 10.1155/2016/3185397
28. Al-Daghri N.M., Clerici M., Al-Attas O., Forni D., Alokail M.S., Alkharfy K.M., Sabico S., Mohammed A.K., Cagliani R., Sironi M. A nonsense polymorphism (R392X) in TLR5 protects from obesity but predisposes to diabetes. *J. Immunol.* 2013;190(7):3716–3720. doi: 10.4049/jimmunol.1202936
29. Ben-Ali M., Corre B., Manry J., Barreiro L.B., Quach H., Boniotto M., Pellegrini S., Quintana-Murci L. Functional characterization of naturally occurring genetic variants in the human TLR1-2-6 gene family. *Hum. Mutat.* 2011;32(6):643–652. doi: 10.1002/humu.21486
30. Smith L.M., Weissenburger-Moser L.A., Heires A.J., Bailey K.L., Romberger D.J., LeVan T.D. Epistatic effect of TLR-1, -6 and -10 polymorphisms on organic dust-mediated cytokine response. *Genes Immun.* 2017;18(2):67–74. doi: 10.1038/gene.2016.51
31. Long H., O'Connor B.P., Zemans R.L., Zhou X., Yang I.V., Schwartz D.A. The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function. *PLoS One*. 2014;9(4):e93550. doi: 10.1371/journal.pone.0093550
32. Balistreri C.R., Candore G., Colonna-Romano G., Lio D., Caruso M., Hoffmann E., Franceschi C., Caruso C. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA*. 2004;292(19):2339–2340. doi: 10.1001/jama.292.19.2339
33. Yin Y.W., Sun Q.Q., Hu A.M., Liu H.L., Wang Q., Zhang B.B. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in myocardial infarction: a meta-analysis of 15,148 subjects. *Hum. Immunol.* 2014;75(2):163–169. doi: 10.1016/j.humimm.2013.11.005
34. Netea M.G., Hijmans A., van Wissen S., Smilde T.J., Trip M.D., Kullberg B.J., de Boo T., van der Meer J.W., Kastelein J.J., Stalenhoef A.F. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004 Feb;34(2):94–99. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01303.x
35. Kiechl S., Lorenz E., Reindl M., Wiedermann C.J., Oberhollenzer F., Bonora E., Willeit J., Schwartz D.A. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med.* 2002;347(3):185–192. doi: 10.1056/NEJMoa012673
36. Peng W., Chen H., Zhao Z., Hu X., Zhou Y., Li Y., Yang L., Wang X., Song J., Liu T., ... Ying B. TLR1 polymorphisms are significantly associated with the occurrence, presentation and drug-adverse reactions of tuberculosis in Western Chinese adults. *Oncotarget*. 2017;9(2):1691–1704. doi: 10.18632/oncotarget.23067
37. Li B., Xia Y., Hu B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020;77(14):2751–2769. doi: 10.1007/s00018-020-03453-7

38. Gregor M.F., Hotamisligil G.S. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu. Rev. Immunol.* 2011;29:415-445. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322
39. Kim S.J., Choi Y., Choi Y.H., Park T. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J. Nutr. Biochem.* 2012;23(2):113-122. doi: 10.1016/j.jnutbio.2010.10.012
40. Edfeldt K., Swedenborg J., Hansson G.K., Yan Z.Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002;105(10):1158-1161.
41. Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Salakhov R.R., Yuzhalin A.E., Zhidkova I.I., Barbarash O.L., Barbarash L.S. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. *Gene.* 2014;550(1):101-109. doi: 10.1016/j.gene.2014.08.022
42. Zhang M., Tang X., Wang Y., Wu S., Wang M., Liu Q., Sandford A.J., He J.Q. Variants of TLR1 associated with tuberculosis susceptibility in the Chinese Tibetan population but not in Han Chinese. *Infect. Genet. Evol.* 2018;61:53-59. doi: 10.1016/j.meegid.2018.02.021
43. Wright S.W., Emond M.J., Lovelace-Macon L., Ducken D., Kashima J., Hantrakun V., Chierakul W., Teparrukkul P., Chantratita N., Limmathurotsakul D., West T.E. Exonic sequencing identifies TLR1 genetic variation associated with mortality in Thais with melioidosis. *Emerg. Microbes Infect.* 2019;8(1):282-290. doi: 10.1080/22221751.2019.1575172

Сведения об авторах:

Михайлова Светлана Владимировна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0897-5473, e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru
Иванощук Динара Евгеньевна, ORCID: 0000-0002-0403-545X, e-mail: dinara2084@mail.ru
Орлов Павел Сергеевич, ORCID: 0000-0001-9371-2178, e-mail: ops86@bionet.nsc.ru
Латынцева Людмила Дмитриевна, к.м.н., ORCID: 0000-0003-1913-5231, e-mail: latyntsevald@bionet.nsc.ru
Каштанова Елена Владимировна, д.б.н., ORCID: 0000-0003-2268-4186, e-mail: elekastanova@yandex.ru
Полонская Яна Владимировна, д.б.н., ORCID: 0000-0002-3538-0280, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru
Рагино Юлия Игоревна, д.м.н., проф., чл.-корр. РАН, ORCID: 0000-0002-4936-8362, e-mail: ragino@bionet.nsc.ru, ragino@mail.ru
Шахтшнейдер Елена Владимировна, к.м.н., ORCID: 0000-0001-6108-1025, e-mail: 2117409@mail.ru

Information about the authors:

Svetlana V. Mikhailova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0897-5473, e-mail: mikhail@bionet.nsc.ru
Dinara E. Ivanoshchuk, ORCID: 0000-0002-0403-545X, e-mail: dinara2084@mail.ru
Pavel S. Orlov, ORCID: 0000-0001-9371-2178, e-mail: ops86@bionet.nsc.ru
Lyudmila D. Latyntseva, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0003-1913-5231, e-mail: latyntsevald@bionet.nsc.ru
Elena V. Kashtanova, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2268-4186, e-mail: elekastanova@yandex.ru
Yana V. Polonskaya, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-3538-0280, e-mail: yana-polonskaya@yandex.ru
Yuliya I. Ragino, doctor of medical sciences, professor, corresponding member of RAS, ORCID: 0000-0002-4936-8362, e-mail: ragino@bionet.nsc.ru, ragino@mail.ru
Elena V. Shakhtshneider, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0001-6108-1025, e-mail: 2117409@mail.ru

Поступила в редакцию 13.02.2023
После доработки 21.04.2023
Принята к публикации 30.04.2023

Received 13.02.2023
Revision received 21.04.2023
Accepted 30.04.2023