

## Новые варианты в генах компонентов соединительной ткани у пациента с аневризмой восходящего отдела аорты

Шипулина С.А.<sup>1,2</sup>, Гончарова И.А.<sup>1</sup>, Слепцов А.А.<sup>1</sup>, Панфилов Д.С.<sup>2,3</sup>, Лелик Е.В.<sup>3</sup>, Козлов Б.Н.<sup>2,3</sup>, Назаренко М.С.<sup>1,2</sup>

1 – НИИ медицинской генетики ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук 634050, г. Томск, ул. Набережная реки Ушайки, д. 10

2 – ФГБОУВО Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2

3 – Научно-исследовательский институт кардиологии  
ФГБНУ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук  
634012, г. Томск, ул. Киевская, д. 111-А

**Введение.** Наряду с известными факторами риска сердечно-сосудистых заболеваний, такими как мужской пол, артериальная гипертензия и курение, предрасположенность к развитию аневризмы восходящей аорты (АВА) в значительной степени определяют и генетические факторы. Зачастую генетическая предрасположенность обусловлена вариантами в генах компонентов соединительной ткани, функционирования гладкомышечных клеток, сигнального пути TGF- $\beta$ . Однако на сегодняшний день не разработана панель генетических маркеров, рекомендованная для оценки риска развития спорадических случаев АВА.

**Цель:** поиск клинически значимых генетических вариантов у пациента со спорадической формой АВА методом массового параллельного секвенирования.

**Методы.** У пациента (48 лет, диаметр восходящей части аорты 50 мм) проведен поиск редких генетических вариантов (частота минорного аллеля <1%), локализованных в экзонах 53 генов наследственных и синдромальных форм АВА. Секвенирование клинического экзона выполнено на платформе SOPHiA GENETICS. Аннотация вариантов была выполнена с использованием программы ANNOVAR. Классификацию вариантов по степени патогенности проводили согласно стандартам и рекомендациям Американской коллегии медицинской генетики и геномики (ACMG) с использованием инструмента VarSome. Валидацию идентифицированных вариантов осуществляли методом секвенирования по Сэнгеру.

**Результаты.** У пациента выявлено три варианта с неясной клинической значимостью в генах *FBN1* – с.C7841T (p.A2614V), *COL3A1* – с.A2498T (p.K833I), и *PLOD3* – с.G833A (rs1041461490, p.G278D). Все найденные варианты идентифицированы при данной патологии впервые. Два варианта локализованы в генах с доказанным максимальным эффектом мутаций на развитие патологии (*FBN1*, *COL3A1*). Третий ген *PLOD3* связан с заболеваниями восходящей аорты на основании экспериментальных исследований, однако в клинической практике его роль в развитии АВА до сих пор не установлена.

**Выводы.** Спорадические АВА развиваются с вовлечением тех же патогенетических путей, что наследственные и синдромальные формы. Тем не менее, паттерн найденных генетических вариантов при спорадических случаях уникален. Для выявления этих особенностей у больных со спорадическими АВА требуется генетическое тестирование по расширенной панели, разработка которой является актуальной прикладной задачей современной медицины.

**Ключевые слова:** аневризма восходящей аорты, однонуклеотидный полиморфизм, дисплазия соединительной ткани.

**Для цитирования:** Шипулина С.А., Гончарова И.А., Слепцов А.А., Панфилов Д.С., Лелик Е.В., Козлов Б.Н., Назаренко М.С. Новые варианты в генах компонентов соединительной ткани у пациента с аневризмой восходящего отдела аорты. *Медицинская генетика* 2024; 23(6): 35-43.

**Автор для корреспонденции:** С.А. Шипулина; **e-mail:** sofia.beliaeva@medgenetics.ru

**Финансирование.** Сбор и анализ информации выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-25-00701.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 18.06.2024

## New variants in the genes of connective tissue components in a patient with ascending aortic aneurysm

Shipulina S.A.<sup>1,2</sup>, Goncharova I.A.<sup>1</sup>, Sleptcov A.A.<sup>1</sup>, Panfilov D.S.<sup>2,3</sup>, Lelik E.V.<sup>3</sup>, Kozlov B.N.<sup>2,3</sup>, Nazarenko M.S.<sup>1,2</sup>

1 – Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences  
10, Ushaika st., Tomsk 634050, Russian Federation

2 – Siberian State Medical University  
2, Moskovsky trakt, Tomsk, 634050, Russian Federation

3 – Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences  
111a, Kievskaya st., Tomsk 634012, Russian Federation

**Background.** Along with common risk factors for cardiovascular disease (male gender, hypertension, smoking) the predisposition to the development of ascending aortic aneurysm is also largely determined by genetic factors. The genetic variants underlying the development of ascending aortic aneurysm are localized in the genes of connective tissue components, smooth muscle cell function, and the TGF- $\beta$  signaling pathway. However, to date, a panel of genetic markers recommended for assessing the risk of developing sporadic cases of ascending aortic aneurysm has not yet been fully developed.

**Aim:** to determine clinically significant genetic variants in a patient with a sporadic ascending aortic aneurysm using the massively parallel sequencing.

**Methods.** We searched for rare genetic variants (minor allele frequency <1%) localized in exons of 53 genes of hereditary and syndromic forms of ascending aortic aneurysm in peripheral blood DNA of a patient (48 years old, diameter of the ascending aorta 50 mm). Clinical exome sequencing was performed on the SOPHiA GENETICS platform. Variant annotation was performed using the ANNOVAR program. Classification of variants according to the degree of pathogenicity was carried out according to the standards and recommendations of the American College of Medical Genetics (ACMG) using the VarSome tool with further validation of identified variants by Sanger sequencing.

**Results.** The sequencing revealed three variants of uncertain significance (VUS) in the following genes: *FBN1* c.C7841T (p.A2614V), *COL3A1* c.A2498T (p.K833I), and *PLOD3* c.G833A (rs1041461490, p.G278D). Detected variants were not previously reported in relation with ascending aortic aneurysm. Two variants are localized in genes with a proven maximum effect of mutations on the development of ascending aortic aneurysm (*FBN1*, *COL3A1*). The third gene, *PLOD3*, is associated with diseases of the ascending aorta based on experimental studies, but in clinical practice its role in the development of ascending aortic aneurysm has not yet been established.

**Conclusion.** Sporadic ascending aortic aneurysms have the same underlying pathogenic pathways as hereditary and syndromic forms. However, the combination of genetic variants found in sporadic cases is unique. To identify these distinctive features in patients with sporadic ascending aortic aneurysm genetic testing using an advanced panel is required. The development of extended genetic panel is a challenge for specialists in cardiogenetics.

**Keywords:** thoracic aortic aneurysm, single nucleotide polymorphism, connective tissue diseases.

**For citation:** Shipulina S.A., Goncharova I.A., Sleptcov A.A., Panfilov D.S., Lelik E.V., Kozlov B.N., Nazarenko M.S. New variants in the genes of connective tissue components in a patient with ascending aortic aneurysm. *Medical genetics [Medicinskaya genetika]* 2024; 23(6): 35-43. (In Russ.)

**Corresponding author:** Sofia A Shipulina; **e-mail:** sofia.believa@medgenetics.ru

**Funding.** Information collection and analysis were carried out with the financial support of the Russian Science Foundation grant No. 22-25-00701.

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

**Accepted:** 18.06.2024

### Введение

Аневризма восходящей аорты (АВА) — жизнеугрожающая патология, которая длительное время протекает бессимптомно и при неблагоприятном исходе может привести к мгновенной смерти пациента вследствие разрыва аорты или ее расслоения. В настоящее время АВА находится на 18 позиции в перечне наиболее частых причин смерти [1]. Бессимптомный характер АВА диктует необходимость не только разработки эффективных методов своевременной диагностики аневризм, не менее важно и заблаговременное выявление лиц с риском развития АВА в будущем. Хотя за по-

следнее время был достигнут значительный прогресс в снижении смертности от острой патологии грудной аорты, почти 50% пациентов с расслоением восходящей аорты умирают до госпитализации [2]. Ежегодно во всем мире выявляют 2-10 новых случаев АВА на 100000 населения, и в настоящее время частота данной патологии в различных популяциях варьирует от 0,16% до 0,34%. Из всех выявленных случаев аневризм аорты патологические изменения восходящей части встречаются у 35% пациентов [1]. АВА часто обнаруживается случайно во время рутинного клинического обследо-

ния, эхокардиографии, магнитно-резонансной и компьютерной томографии.

Этиология АВА гетерогенна. Выделяют синдромальные (с вовлечением других систем органов) и несиндромальные АВА, которые подразделяются на семейные и спорадические [3,4]. Синдромальные АВА развиваются при синдромах Марфана, Лойса-Дитца, Элерса-Данло, а семейные случаи характеризуются диспластическими изменениями соединительной ткани. Около 20% пациентов с АВА имеют семейную историю аневризм, среди которых 30% могут быть объяснены мутациями в более чем 30 генах [5]. Спорадические АВА являются диагнозом исключения в том случае, если пациент не имеет симптомов, характерных для синдромальных форм, и подтвержденного семейного анамнеза заболевания. Они составляют 80% всех АВА [3]. Однако в 4-5% случаев даже у пациентов со спорадическими формами выявляются патогенные или вероятно патогенные варианты в генах предрасположенности к АВА [6].

Развитие спорадических АВА связано с наиболее распространенными факторами риска других сердечно-сосудистых заболеваний: пожилым возрастом, мужским полом, курением, длительной артериальной гипертензией, дислипидемией. Несмотря на приобретенный характер, невозможно исключить генетический вклад в развитие спорадических случаев АВА. С генетической точки зрения все формы АВА характеризуются высокой гетерогенностью с вовлечением широкого спектра генетических вариантов от очень редких с высокой пенетрантностью до распространенных, выявленных в исследованиях GWAS и обеспечивающих более низкий риск развития заболевания [7,8]. Большинство генов, вовлеченных в патогенез АВА, кодирует белки внеклеточного матрикса, отвечает за метаболизм и сокращение сосудистых гладкомышечных клеток и/или участвует в сигнальном пути трансформирующего фактора роста-бета (TGF- $\beta$ ). Появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что именно изменения в передаче сигналов TGF- $\beta$  являются основным этиологическим фактором большинства АВА [4].

На сегодняшний день работ, в которых выполнено молекулярно-генетическое обследование пациентов с АВА с использованием секвенирования экзома/клинического экзома, крайне мало. Выявленные редкие патогенные варианты (унаследованные или *de novo*) вызывают более тяжелые проявления заболевания с ранней манифестацией (риск расслоения в возрасте до 55 лет) и обычно демонстрируют доминантный тип наследования [9]. Течение АВА может сильно

различаться у разных пациентов в зависимости от вовлеченного гена или патогенного варианта, что делает молекулярную диагностику актуальной для принятия клинических решений относительно последующего наблюдения и планового хирургического вмешательства. Вместе с тем, зачастую при проведении генетических исследований в одну группу объединяются семейные и спорадические случаи, а также аневризмы и диссекции аорты, тогда как возможно, что для каждой из этих категорий существует уникальный спектр клинически значимых вариантов.

Целью исследования стал поиск клинически значимых генетических вариантов у пациента со спорадической формой АВА методом массового параллельного секвенирования.

### Пациент и методы

Мужчина 1973 г.р. обратился в НИИ Кардиологии Томского НИМЦ с диагнозом *аневризма восходящего отдела аорты* для прохождения оперативного лечения в 2022 г. От пациента было получено информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено локальными этическими комитетами НИИ Медицинской генетики (протокол номер 13 от 15.11.2021 г.) и НИИ Кардиологии (протокол номер 213 от 12.05.2021 г.) ТНИМЦ и проведено в соответствии с основополагающими этическими принципами Хельсинкской Декларации.

В апреле 2022 г. пациенту проведено открытое хирургическое вмешательство в объеме протезирования восходящей аорты. Взятие венозной периферической крови для выделения ДНК проводилось интраоперационно. Размеры аорты определяли методом мультиспиральной компьютерной томографии перпендикулярно продольной оси с захватом стенки на нескольких уровнях в соответствии с национальными рекомендациями. Мультиспиральная компьютерная томография аорты выполнялась на 64-срезовом томографе GE Discovery NM/CT 570C (GE Healthcare, США) со следующими параметрами: 200-400 мА, 100-120 кВт. Изображения были реконструированы с толщиной среза 0,65 мм. Инъекцию контрастного вещества со скоростью 5 мл/сек проводили через локтевую вену при помощи автоматического инжектора. Общий объем контраста рассчитывали в зависимости от веса пациента в расчете 1 мл на 1 кг массы тела. С целью лучшей визуализации корня и восходящего отдела аорты и исключения артефактов выполняли ЭКГ-синхронизированное исследование от бифуркации сонных артерий до диафрагмы.

Полученные изображения обрабатывали на специализированной рабочей станции Advantage Workstation 4.3 (GE Healthcare, США). С помощью компьютерной томографии определена степень кальцификации аорты и коронарных сосудов и рассчитан индекс Агатстона.

Заключение о наличии сопутствующих патологий делали на основании анамнеза и инструментальных исследований, включающих дуплексное ультразвуковое исследование магистральных артерий (сонных, подключичных и бедренных), эхокардиографию, коронароангиографию.

#### Медико-генетическое консультирование

Врачом-генетиком было проведено клинико-генетическое обследование пациента в формате анкетирования и функционального тестирования по шкалам Марфана и Бейтона для выявления признаков диспластических изменений соединительной ткани.

#### Секвенирование клинического экзоза

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови производили методом фенол-хлороформной экстракции. ДНК растворяли в ТЕ-буфере, pH 8,0. Качество и количество ДНК проверяли на спектрофотометре Nanodrop 8000 (Thermo, США), флуориметре Qubit 3 (Thermo, США), а также с помощью 1% агарозного геля LE с 1X TAE-буфером, pH 8,0.

Секвенирование клинического экзоза выполнено на платформе SOPHiA GENETICS. Пробоподготовку ДНК-библиотек проводили с использованием набора Clinical Exome Solution (Sophia Genetics, Швейцария), KAPA Library Amplification kit KK2620 (Roche, Германия) и магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США) по протоколу Clinical Exome Solution (Sophia Genetics, Швейцария). Анализ ДНК-библиотек проводили с использованием флуориметра Qubit 3 (Thermo, США) и системы капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (Agilent, США) согласно протоколу производителя. Секвенирование клинического экзоза выполнено на приборе NextSeq 500 с набором NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (300 циклов в режиме секвенирования по 150 п.н. с обоих концов фрагментов ДНК-библиотеки) согласно протоколу производителя.

Прочтения были выравнены на референсный геном (GRCh38) с использованием Illumina DRAGEN Bio-IT. Аннотация вариантов была выполнена с использованием программы ANNOVAR.

Классификацию выявленных вариантов по степени патогенности проводили согласно рекоменда-

циям Американской коллегии медицинской генетики и геномики по интерпретации вариантов последовательностей (ACMG standards and guidelines for the interpretation of sequence variants), с использованием инструментов VarSome The Human Genomics Community, AlphaMissense, а также баз данных RUSeq (дата доступа 01.05.2024) и gnomAD (v.4.1.0, дата доступа 01.05.2024).

#### Поиск редких генетических вариантов

У пациента проведен поиск редких генетических вариантов (частота минорного аллеля <1%), локализованных в экзонах 53 генов наследственных и синдромальных форм АВА (табл. 1). Выбор генов проводился на основании данных, представленных в базе ClinGen и в научной литературе.

#### Секвенирование по Сэнгеру

Валидацию идентифицированных вариантов с клинической значимостью в генах *FBN1*, *COL3A1* и *PLOD3* осуществляли путём прямого двунаправленного секвенирования по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

ПЦР проводили с использованием готовой реакционной смеси HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Россия) и подобранных праймеров (табл. 2) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Визуализацию и анализ результатов секвенирования ДНК по Сэнгеру осуществляли с использованием программного обеспечения UGENE (v42.0 Unipro, Россия).

#### Результаты

По результатам сбора семейного анамнеза было установлено, что пациент не имел родственников 1 и 2 степеней родства с АВА. Родители, со слов пациента, не имеют жалоб со стороны сердечно-сосудистой системы. Итоговые баллы по шкалам Марфана и Бейтона составили 1/20 и 1/9, соответственно. Анкетирование также не выявило прямых или косвенных признаков дисплазии соединительной ткани (за исключением АВА), из чего было сделано заключение о спорадическом характере заболевания.

Среди факторов риска развития аневризмы аорты и других сердечно-сосудистых заболеваний у пациента диагностирована артериальная гипертензия. Статус курения отрицательный (табл. 3). Кроме этого у пациента обнаружена мочекаменная болезнь с микролитами в полостной системе обеих почек. По результатам инструментального обследования у пациента не выяв-

Таблица 1. Кандидатные гены для поиска генетических вариантов.

Table 1. Candidate genes for genetic variants searching.

| Ген           | Локус          | Ген             | Локус          | Ген            | Локус        |
|---------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|
| <i>ACTA2</i>  | 10q23.31       | <i>ELN</i>      | 7q11.23        | <i>COL1A2</i>  | 7q21.3       |
| <i>COL3A1</i> | 2q32.2         | <i>FBN2</i>     | 5q23.3         | <i>COL4A1</i>  | 13q34        |
| <i>FBN1</i>   | 15q21.1        | <i>FLNA</i>     | Xq28           | <i>COL5A1</i>  | 9q34.3       |
| <i>MYH11</i>  | 16p13.11       | <i>HCN4</i>     | 15q24.1        | <i>COL5A2</i>  | 2q32.2       |
| <i>MYLK</i>   | 3q21.1         | <i>MAT2A</i>    | 2p11.2         | <i>COL9A1</i>  | 6q13         |
| <i>SMAD3</i>  | 15q22.33       | <i>NOTCH1</i>   | 9q34.3         | <i>COL9A2</i>  | 1p34.2       |
| <i>TGFB2</i>  | 1q41           | <i>PKD1</i>     | 16p13.3        | <i>EMILIN1</i> | 2p23.3       |
| <i>TGFBR1</i> | 9q22.33        | <i>PKD2</i>     | 4q22.1         | <i>ENG</i>     | 9q34.11      |
| <i>TGFBR2</i> | 3p24.1         | <i>SKI</i>      | 1p36.33-p36.32 | <i>GATA5</i>   | 20q13.33     |
| <i>LOX</i>    | 5q23.1         | <i>SLC2A10</i>  | 20q13.12       | <i>GJA1</i>    | 6q22.31      |
| <i>PRKG1</i>  | 10q11.23-q21.1 | <i>SMAD4</i>    | 18q21.2        | <i>JAG1</i>    | 20p12.2      |
| <i>EFEMP2</i> | 11q13.1        | <i>TGFB3</i>    | 14q24.3        | <i>MED12</i>   | Xq13.1       |
| <i>FOXE3</i>  | 1p33           | <i>ACVRL1</i>   | 12q13.13       | <i>PLOD1</i>   | 1p36.22      |
| <i>MFAP5</i>  | 12p13.31       | <i>ADAMTS10</i> | 19p13.2        | <i>PLOD3</i>   | 7q22.1       |
| <i>SMAD2</i>  | 18q21.1        | <i>B3GAT3</i>   | 11q12.3        | <i>SMAD6</i>   | 15q22.31     |
| <i>BGN</i>    | Xq28           | <i>COL11A1</i>  | 1p21.1         | <i>UPF3B</i>   | Xq24         |
| <i>CBS</i>    | 21q22.3        | <i>COL18A1</i>  | 21q22.3        | <i>VCAN</i>    | 5q14.2-q14.3 |
| <i>COL4A5</i> | Xq22.3         | <i>COL1A1</i>   | 17q21.33       |                |              |

Таблица 2. Гены и последовательности праймеров для секвенирования по Сэнгеру.

Table 2. Genes and primer sequences for Sanger sequencing.

| Ген           | Экзон | Последовательность                                             |
|---------------|-------|----------------------------------------------------------------|
| <i>COL3A1</i> | ex36  | F 5'- GCTGAGAGATTGCTGTTG -3'<br>R 5'- GGTGCTGAGATTCATACTTG -3' |
| <i>FBN1</i>   | ex64  | F 5'- GACAGCCACACAGGTAA -3'<br>R 5'- CATAGCAAGAAGCCACATC -3'   |
| <i>PLOD3</i>  | ex8   | F 5'- GCTGGAAGATGCAACAC -3'<br>R 5'- GGAAACGGTCCCACTAA -3'     |

Таблица 3. Клинические характеристики пациента.

Table 3. Patient's clinical characteristics

| Характеристики                                                 | Показатель      |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|
| Возраст                                                        | 48 лет          |
| Индекс массы тела                                              | 25,3            |
| Диаметр корня аорты                                            | 43 мм           |
| Диаметр восходящей аорты                                       | 50 мм           |
| Диаметр проксимальной части дуги                               | 33 мм           |
| Аортальный клапан                                              | трикуспидальный |
| Артериальная гипертензия                                       | да              |
| Курение                                                        | нет             |
| Гиперлипидемия                                                 | нет             |
| Сахарный диабет                                                | нет             |
| Стенокардия, ишемическая болезнь сердца или инфаркт миокарда   | нет             |
| Атеросклероз коронарных артерий                                | нет             |
| Атеросклероз сонных артерий                                    | нет             |
| Толщина интима-медия сонных артерий                            | 0,7 мм          |
| Уровень кальцификации в коронарных артериях (индекс Агатстона) | 0               |
| Уровень кальцификации аорты (индекс Агатстона)                 | 0               |

лено атеросклеротических бляшек в коронарных, сонных артериях или аорте.

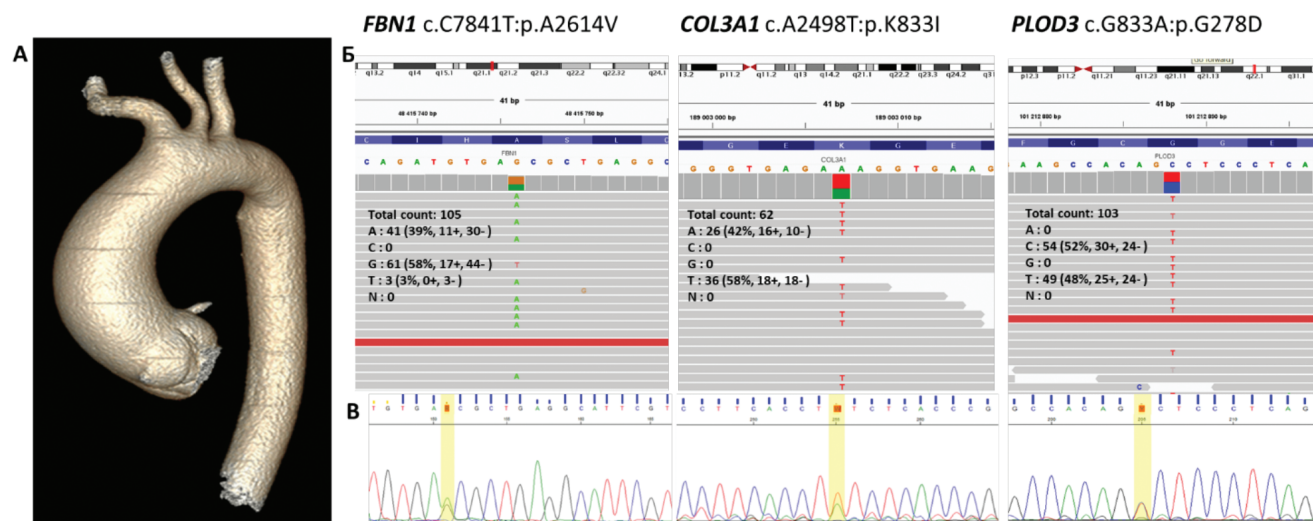
По результатам массового параллельного секвенирования у пациента (возраст на момент взятия материала составил 48 лет) с АВА с диаметром восходящей части 50 мм выявлено три миссенс-варианта неясного клинического значения в генах *FBN1*, *COL3A1* и *PLOD3* (рисунок).

Вариант с.С7841Т (р.А2614V) в гене *FBN1* (рис.) у пациента с АВА идентифицирован впервые. Однако хорошо известно, что патогенные варианты в гене *FBN1* являются причиной синдрома Марфана [OMIM 154700]. Вариант зарегистрирован в базе gnomAD (частота аллеля  $6,2 \times 10^{-7}$ ). Потенциальная патогенность варианта исследовалась с использованием нескольких инструментов *in silico*. По оценкам VarSome этот вариант оценен как патогенный по данным только одного предиктора (MutPred), тогда как 7 предикторов (BLOSUM, DANN, FATHMM, FATHMM-MKL, MVP, PrimateAI, SIFT4G) оценивали его как вариант с неясной клинической значимостью (VUS) и 15 – как доброкачественный. По шкале CADD (PHRED) данный вариант оценивается как патогенный (CADD Score – 22,1). Согласно инструменту AlphaMissense, замена р.Аla2614Val в белке FBN1 классифицируется как вероятно доброкачественная. В той же позиции

(chr15:48415746) описан другой вариант с.7841С>А р.(Аla2614Asp), который по шкалам предикции патогенности VarSome также отнесен к VUS. Для данного варианта также нет информации по связи с заболеваниями.

Второй VUS с.А2498Т (р.К833I) выявлен в гене *COL3A1* (рис.). Данный вариант с.2498А>Т не представлен в популяционных базах gnomAD и RUSeq, и его связь с патологией неизвестна. Шкала предикции патогенности VarSome по восьми предикторам относит этот вариант к патогенным (DEGEN2, FATHMM-MKL, SIFT, PROVEAN, M-CAP и др.), 12 предикторов характеризуют вариант как VUS, 3 – как доброкачественный, а по CADD (PHRED) вариант так же относится к патогенным (CADD Score – 23,5). Инструмент AlphaMissense классифицирует замену р.Lys833Ile в белке COL3A1 как вероятно патогенную. По данным ресурса ClinVar, в этой позиции (chr2:189003007) ранее описан rs371344739 (с.А2498G>р.К833R, ID199701), частота которого у европейцев составляет 0,00013 (gnomAD) и который также является VUS. Мутации в гене *COL3A1* связаны с синдромом Элерса-Данло сосудистого типа, аневризмами аорты и других артерий [OMIM 210180].

Третий VUS с.G833A (rs1041461490, р.G278D) у пациента идентифицирован в гене *PLOD3* (рисунок).



**Рисунок.** Идентификация вариантов с.С7841Т:р.А2614V в гене *FBN1*, с.А2498Т:р.К833I в гене *COL3A1* и с.G833A:р.G278D в гене *PLOD3* у пациента №54. (А) Мультиспиральная компьютерная томография грудного отдела аорты. (Б) Результаты секвенирования клинического экзоста. (Б) Валидация генетических вариантов секвенированием по Сэнгеру.

**Figure.** Genetic variants *FBN1* c.С7841Т:р.А2614V, *COL3A1* c.А2498Т:р.К833I and *PLOD3* c.Г833А:р.Г278D identification in patient No. 54. (А) Multispiral computed tomography of the thoracic aorta. (Б) Clinical exome sequencing results. (Б) Validation of genetic variants by Sanger sequencing.

Вариант зарегистрирован в популяционных базах gnomAD (частота аллеля —  $6,8 \times 10^{-6}$ ) и RUSseq (частота аллеля —  $5,9 \times 10^{-4}$ ), в базе ClinVar (ID1386463) обозначен как VUS, но о его связи с заболеваниями информации нет. Согласно VarSome, 11 предикторов относят данный вариант к патогенным (MutPred, DEOGEN2, FATHMM-MKL, EIGEN, PROVEAN и др.), 10 — к VUS и лишь 1 предиктор классифицирует данный вариант как непатогенный (FATHMM). Шкала предикции патогенности CADD (PHRED) относит данный вариант к патогенным (CADD Score — 28,2). Инструмент AlphaMissense классифицирует замену аминокислот p.Gly278Asp в белке PLOD3 как неоднозначную (ambiguous), не относя ее ни к патогенным, ни к доброкачественным. К настоящему времени накапливаются данные о связи патогенных вариантов гена *PLOD3* с патологией соединительной ткани с сосудистыми осложнениями, семейными и спорадическими аневризмами артерий различной локализации в некоторых популяциях [10].

### Обсуждение

Проведенное молекулярно-генетическое обследование показало, что у пациента со спорадической АБА аорты отсутствуют патогенные и вероятно патогенные варианты в 53 генах наследственных АБА. Выявлено три варианта с неясной клинической значимостью, два из которых (*FBN1* с.С7841Т, р.А2614V и *COL3A1* с.А2498Т, р.К8331) локализованы в генах с доказанным максимальным эффектом мутаций на развитие патологии [11]. Третий ген *PLOD3*, в котором был найден вариант с.G833A (р.G278D), связан с заболеваниями восходящей аорты на основании экспериментальных исследований, однако в клинической практике его роль пока что не доказана [11]. Белки *FBN1* и *COL3A1* являются структурными компонентами внеклеточного матрикса, а фермент *PLOD3* обеспечивает прочность поперечных сшивок в молекулах коллагенов.

Длительное время для определения необходимости оперативного вмешательства на восходящей аорте в качестве основного критерия использовали ее размер: диаметр восходящей части  $>55$  мм свидетельствовал о необходимости протезирования. Однако клинические исследования показали, что изолированная оценка диаметра восходящей аорты — ненадежный прогностический критерий расчета индивидуального риска для пациента [12]. В клинической практике риск разрыва аневризмы оценивается по нескольким геометрическим и механическим параметрам. Так, недавние ис-

следования показали возможность оценки параметров эластичности аорты для предоперационной стратификации пациентов [13]. Кроме этого, на сегодняшний день для принятия решения об операции необходимо оценить скорость роста аневризмы: ежегодное увеличение диаметра аорты более, чем на 5 мм (или более, чем на 3 мм в течение двух лет подряд), сигнализирует о необходимости оперативного вмешательства [4]. В последние годы все активнее обсуждается вопрос о необходимости профилактического протезирования восходящей аорты в случаях, когда не достигнут критерий размера, установленный в современных рекомендациях, поскольку в ряде случаев риск разрыва аневризмы сильно превышает риск от операции. Однако несмотря на очевидную генетическую составляющую в развитии патологии, в РФ до сих пор не внедрена практика стратификации пациентов на группы с высоким и низким риском разрыва аневризмы аорты на основании предварительного генетического тестирования.

На сегодняшний день описано более 60 генов, потенциально вовлеченных в патогенез АБА. Тем не менее, только 24 гена из этого списка попали в базу ClinGen (из них сильная связь с патологией была выявлена только для 11) [11]. Эти гены (включая *FBN1* и *COL3A1*) предложены в качестве панели для таргетного тестирования пациентов с АБА [8]. Ген *PLOD3* не входит в эту панель, т.к. ранее не был ассоциирован с развитием аневризм аорты, однако миссенс-вариант VUS с.С534А (р.С178R) в его функциональном гомологе *PLOD1* приводил к высокопенетрантной семейной форме АБА с аутосомно-доминантным наследованием [14]. Также известно, что мутации в генах, связанных с синдромальными АБА (например, *FBN1* или *COL3A1*, варианты в которых обнаружены в нашем исследовании), описаны при спорадических случаях АБА, однако по каким-то причинам не приводили к системным проявлениям, что сильно осложняет диагностику спорадических аневризм. Рекомендуемые к тестированию гены — это гены наследственных аневризм, однако не исключено, что в развитие спорадических АБА могут быть вовлечены и другие, менее очевидные гены-кандидаты, что подтверждается несколькими независимыми исследованиями [3,15].

В данном исследовании у пациента выявлены варианты с неопределенной клинической значимостью в генах наследственных аневризм, относительно высокая частота встречаемости которых ранее описана у пациентов с АБА. Так, например, в смешанных группах больных с аневризмой и расслоением аорты (синдромальные, семейные и спорадические случаи) доля

пациентов с идентифицированными VUS составляет от 2% до 39% [7]. Помимо этого, у пациента наблюдали ранний возраст манифестации заболевания (48 лет). Экзомное секвенирование при диссекции восходящей аорты с ранней манифестацией (<56 лет) выявило 1-3 VUS в генах наследственных аневризм у 30% пациентов [16]. При спорадических аневризмах и расслоении грудной аорты большинство VUS приходится на гены *FBN1*, *MYH11* и *COL3A1* [16]. Более того, в нашей работе идентифицированные VUS были миссенс-вариантами, что согласуется с исследованием Arnaud с соавт. (2019) [7]. Медико-генетическое консультирование может быть рекомендовано родственникам (в особенности — детям) пациентов со спорадическими АВА с ранней манифестацией даже в отсутствие «синдромальных» признаков.

В литературе существуют рекомендации по добавлению таргетного генетического тестирования в комбинации с визуализацией аорты для более достоверного расчета индивидуального риска для пациента [17]. Предложены критерии для профилактического протезирования восходящей аорты при ее аневризме, включающие комбинацию из оценки диаметра аорты и генетического тестирования. Так, при выявлении патогенных вариантов в генах *FBN1* или *COL3A1* планировать проведение операции на восходящей аорте можно раньше, даже когда значения ее диаметра не достигают общепринятых 55 мм [18]. У обсуждаемого пациента были найдены VUS в обоих генах, а операция была проведена при диаметре АВА 50 мм. Своевременная детекция этих вариантов и четкое знание их функциональной значимости, возможное после проведения дополнительных исследований, могло бы стать показанием к операции на более ранних сроках при условии классификации этих вариантов как патогенных. Для хирурга имеет значение учет генетических вариантов при определении показаний для хирургического вмешательства на восходящей аорте у пациентов со спорадическими АВА, предрасположенность к которой может ограничиваться не только известными вариантами в генах наследственных аневризм [8]. С учетом этого, важно проводить исследования, выявляющие новые варианты и подтверждающие их связь с развитием спорадических АВА, имеющих свой уникальный генетический профиль.

У обсуждаемого пациента были одновременно найдены три VUS в генах, влияющих на развитие АВА. Прогнозирование потенциально патогенных комбинаций вариантов у пациентов остается ключевой задачей в области медицинской генетики для понимания

и выявления олиогенных/мультилокусных заболеваний. Существует множество биоинформатических инструментов для предсказания патогенности вариантов в генах менделирующих заболеваний. Наиболее современные инструменты способны предсказывать патогенность для дигенных (билокусных) комбинаций вариантов (VarCoPP2.0, ORVAL) [19], однако остается открытым вопрос достоверного предсказания патогенности группы из более чем двух вариантов, встречающихся у пациента одновременно. Ведь не всегда их совместное влияние будет представлять собой сумму эффектов каждого: они могут взаимно усиливать, или наоборот, ослаблять действие друг друга за счет эпистатического взаимодействия.

Хотя большинство исследований на сегодняшний день сосредоточено на патогенных и вероятно патогенных вариантах в генах наследственных аневризм и их вкладе в заболевание, функциональные исследования влияния VUS на развитие АВА в целом и спорадических АВА в частности немногочисленны [20]. Как правило, редкие (частота минорного аллеля <0,5%) низкопенетрантные варианты, увеличивающие риск диссекции аорты в сочетании с факторами окружающей среды или другими низкопенетрантными вариантами, труднее классифицировать как патогенные, т.к. они обычно требуют больших когорт для подтверждения ассоциации с заболеванием. Актуальной является разработка системы классификации вариантов в генах, ассоциированных с развитием АВА, выходящей за рамки «патогенных» и «доброкачественных» [20]. Существует необходимость дополнительной оценки стохастических проявлений низкопенетрантных вариантов или учета их взаимодействия с факторами окружающей среды или другими генетическими предикторами неблагоприятных сосудистых событий.

На сегодняшний день нет однозначного подтверждения тому, что VUS могут спровоцировать дилатацию восходящей аорты, поэтому некоторые исследователи считают, что эти варианты не должны учитываться при проведении диагностики и оценке индивидуального риска развития АВА. Выполнение новых исследований может подтвердить функциональную значимость генетических вариантов, что приведет к смещению оценки патогенности и смене категорий вариантов. Даже варианты неопределенной значимости могут повышать риск развития аневризмы грудной аорты в сочетании с другими генетическими и негенетическими факторами риска [20]. Поэтому пациенты с выявленными в ходе генетического тестирования VUS должны находиться под наблюдением, включая

периодическую визуализацию аорты, до тех пор, пока диагноз не будет подтвержден или опровергнут.

### Выводы

Спорадическая форма АВА характеризуется уникальным генетическим паттерном, включающим широкий спектр вариантов, часть из которых в дальнейшем может перейти в разряд патогенных, а часть, возможно, будет определена как новый класс редких «предрасполагающих» низкопенетрантных вариантов, приводящих к развитию патологии в совокупности с другими факторами риска.

Подтверждение значимости VUS в развитии АВА связано не только с проведением экспериментальных исследований, но и с необходимостью генетического тестирования родственников первой/второй степени родства и клиническим наблюдением носителей предполагаемых причинных вариантов с регламентированной визуализацией аорты с момента выявления генетического варианта до окончательного подтверждения или исключения диагноза.

### Интернет-ресурсы/ Internet resources

1. GWAS catalog:
2. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=thoracic%20aortic%20aneurysm>
3. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/genes/MYH11>
4. <https://www.ebi.ac.uk/gwas/genes/FBN1>
5. ClinGen: <https://clinicalgenome.org/>, дата доступа 11.01.2023
6. VarSome The Human Genomics Community: <https://varsome.com/>
7. PrimerQuest Tool: <https://eu.idtdna.com/pages>
8. Primer Design and Search Tool: <http://bisearch.enzim.hu/>
9. NCBI:
10. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1317299348>
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs371344739>
12. CADD: Combined Annotation Dependent Depletion: <https://cadd.gs.washington.edu/snv>
13. gnomAD browser: <https://gnomad.broadinstitute.org>, дата доступа 11.01.2023
14. RUSeq Browser: <http://ruseq.ru/>, дата доступа 11.01.2023

### Литература/References

1. Deng J., Li D., Zhang X., et al. Murine model of elastase-induced proximal thoracic aortic aneurysm through a midline incision in the anterior neck. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Feb 6;10:953514.
2. Howard D.P.J., Banerjee A., Fairhead J.F., et al. Population-Based Study of Incidence and Outcome of Acute Aortic Dissection and Premorbid Risk Factor Control. *Circulation*. 2013 May 21;127(20):2031–7.

3. Salmasi M.Y., Alwis S., Cyclewala S., et al. The genetic basis of thoracic aortic disease: The future of aneurysm classification? *Hell J Cardiol*. 2023;69:41–50.
4. Bhandari R., Aatre R.D., Kanthi Y. Diagnostic approach and management of genetic aortopathies. *Vasc Med*. 2020 Feb 1;25(1):63–77.
5. Verstraeten A., Luyckx I., Loeys B. Aetiology and management of hereditary aortopathy. *Nat Rev Cardiol*. 2017 Apr;14(4):197–208.
6. Weerakkody R., Ross D., Parry D.A., et al. Targeted genetic analysis in a large cohort of familial and sporadic cases of aneurysm or dissection of the thoracic aorta. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2018 Nov;20(11):1414–22.
7. Arnaud P., Hanna N., Benarroch L., et al. Genetic diversity and pathogenic variants as possible predictors of severity in a French sample of nonsyndromic heritable thoracic aortic aneurysms and dissections (nshTAAD). *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2019 Sep;21(9):2015–24.
8. Milewicz D.M., Guo D., Hostetler E., et al. Update on the genetic risk for thoracic aortic aneurysms and acute aortic dissections: implications for clinical care. *J Cardiovasc Surg (Torino)*. 2021 Jun;62(3):203–10.
9. Rodrigues Bento J., Meester J., Luyckx I., et al. The Genetics and Typical Traits of Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2022 Aug 31;23:223–53.
10. Ewans L.J., Colley A., Gaston-Massuet C., et al. Pathogenic variants in PLOD3 result in a Stickler syndrome-like connective tissue disorder with vascular complications. *J Med Genet*. 2019 Sep;56(9):629–38.
11. Renard M., Francis C., Ghosh R., et al. Clinical Validity of Genes for Heritable Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Aug 7;72(6):605–15.
12. Kontopodis N., Pantidis D., Dedes A., et al. The – Not So – Solid 5.5 cm Threshold for Abdominal Aortic Aneurysm Repair: Facts, Misinterpretations, and Future Directions. *Front Surg*. 2016 Jan 25;3:1.
13. Sazonova S.I., Saushkin V.V., Panfilov D.S., et al. Insights into ascending aortic aneurysm: Interactions between biomechanical properties of the aortic wall and tissue biomarkers. *Heliyon*. 2024 Jan 15;10(1):e23538.
14. Koenig S.N., Cavus O., Williams J., et al. New mechanistic insights to PLOD1-mediated human vascular disease. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2022 Jan;239:1–17.
15. Li Y., Gao S., Han Y., et al. Variants of Focal Adhesion Scaffold Genes Cause Thoracic Aortic Aneurysm. *Circ Res*. 2021 Jan 8;128(1):8–23.
16. Guo D.C., Hostetler E.M., Fan Y., et al. Heritable Thoracic Aortic Disease Genes in Sporadic Aortic Dissection. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Nov 28;70(21):2728–30.
17. Reddy P., Nair K.S., Kumar V., et al. Thoracic Aortic Aneurysmal Disease: Comprehensive Recommendations for the Primary Care Physician. *Mayo Clin Proc*. 2024 Jan;99(1):111–23.
18. Brownstein A.J., Kostiuik V., Ziganshin B.A., et al. Genes Associated with Thoracic Aortic Aneurysm and Dissection: 2018 Update and Clinical Implications. *Aorta Stamford Conn*. 2018 Feb;6(1):13–20.
19. Versbragen N., Gravel B., Nachtegaal C., et al. Faster and more accurate pathogenic combination predictions with VarCoPP2.0. *BMC Bioinformatics*. 2023 May 1;24(1):179.
20. Kwartler C.S., Gong L., Chen J., et al. Variants of Unknown Significance in Genes Associated with Heritable Thoracic Aortic Disease Can Be Low Penetrant “Risk Variants.” *Am J Hum Genet*. 2018 Jul 5;103(1):138–43.