

А.Ж. Ахметова<sup>1</sup>, Ж.М. Абилова<sup>1</sup>, С.Е. Рахимова<sup>1</sup>, У.Е. Каиров<sup>1</sup>,  
М.С. Бекбосынова<sup>2</sup>, Ч. Гули<sup>3</sup>, А.Р. Акильжанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Өмір туралы ғылымдар орталығы, Назарбаев Университеті, Астана, Қазақстан;

<sup>2</sup>Ұлттық ғылыми кардиохирургиялық орталығы, Астана, Қазақстан;

<sup>3</sup>Медициналық зерттеулер орталығы, Грац қаласының Медициналық университеті, Австрия  
(E-mail: ainur.akhmetova2@nu.edu.kz)

## Аритмогендік синдромдарды таргетті секвенирлеуге арналған кітапханаларды дайындау ерекшеліктері

Мақалада Illumina платформасына арналған пайдаланушы кардиогенетикалық панелін пайдалана отырып, әртүрлі аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 генді таргетті байыту әдісімен таргетті секвенирлеу үшін ДНҚ кітапханаларын дайындаудың әдістемесі сипатталған. Таргетті гендердің ДНҚ кітапханалары әртүрлі аритмогендік синдромдары бар 65 науқасқа дайындалды. Хаттама 225 нг геномдық ДНҚ үлгілерінен ДНҚ кітапханаларын әзірлеуге оңтайландырылды. Бақылау ретінде p/n G9901C (Agilent Technologies, АҚШ) жиынтығымен бірге жеткізілген байытылған бақылау ДНҚ-сы (Enrichment Control DNA) пайдаланылды. Ең алдымен, барлық 65 науқастың ДНҚ үлгілері рестрикциялық ферменттер көмегімен әртүрлі фрагменттерге бөлінді және денатурацияланды. Содан кейін, сақиналы ДНҚ молекулаларын құру үшін зондтар кітапханасы таргетті фрагменттерге гибридизацияланды. Келешекте биоинформатикалық талдау кезінде үлгілерді идентификациялау үшін 65 үлгіге әртүрлі 65 индекс сиквенстері қосылды. Зондтар биотинделді және таргетті фрагменттер магнитті стрептавидинді шарлар көмегімен бөлініп алынды. Кейін сақиналы ДНҚ молекулалары лигация үрдісі кезінде біріктірілді. Таргетті фрагменттер полимеразды тізбек реакциясы көмегімен амплификацияланды, нәтижесінде алынған индекстелген амплификация өнімдері Illumina HiSeq2000 жаңа буынды секвенаторында секвенирлеуге жіберілді.

*Кілт сөздер:* аритмогендік синдромдар, таргетті секвенирлеу, ДНҚ кітапханалары, заманауи кардиология.

### Кіріспе

Жүрек ритмі зақымдануларының этиологиясын зерттеу өзектілігі ауру көрсеткіштері мен өлім көрсеткіштерінің жоғары болуымен және аритмиялар нәтижесінде кенеттен жүрек өлімінің дамуымен анықталады. Кенеттен жүрек өлімі (КЖӨ) заманауи кардиологияда шешілмеген маңызды мәселелердің бірі болып қалуда. Жыл сайын КЖӨ көптеген белсенді, еңбекке жарамды адамдар өмірін алып кетуде, қайтыс болғандардың 20 % жағдайында анық кардиологиялық аурулар болмаған [1–4]. КЖӨ себептері науқастың жасына байланысты әртүрлі болады. Мысалы, балаларда КЖӨ кенеттен өлім синдромы, белгілі жүрек аурулары (тіршілікке қауіпті жүрек ритмінің зақымданулары, кардиомиопатиялар, туа біткен жүрек кемістігі, бастапқы өкпе гипертензиясы, оң қарыншаның аритмогенді дисплазиясы және т.б.) түрінде сипатталған [5–7]. Ал ересек адамдарда КЖӨ даму механизмі көп жағдайда жүрек қарыншаларының өте жиі қысқартылуымен байланысты, кейбір жағдайларда брадиаритмиямен (жиі жүрек ритмі) және асистолиямен (жүректің тоқтауы) байланысты [8, 9]. 35 жастан төмен науқастарда басқа ишемиялық емес сипаттағы этиологиялардың әсері көрсетілген [10–13]. Жүрек ауруларынан қайтыс болған науқастардың көбісінде (80 %) жүректің ишемиялық ауруы (ЖИА) анықталды, сонымен қатар КЖӨ қауіпіне дилатациялық кардиомиопатия және жүрек ақауы бар қарт науқастар душар етеді [10]. КЖӨ гипертрофикалық кардиомиопатия [14–17], оң қарыншалы аритмогенді кардиомиопатия [5, 8], сонымен қатар Фалло тетрадасын радикалды түзетуден кейінгі қарт науқастарда [9], әсіресе сол қарынша дисфункциясы бар науқастарда кездеседі. Ал Бругада синдромы, туа біткен ұзартылған QT синдромы қарт науқастарда КЖӨ кезінде жиі кездесетін себептердің бірі болып табылмайды [18]. Кенет жүрек өлімінің дамуы 95 % жағдайда қарыншалық тахикардия мен қарыншалар фибрилляциясымен байланысты, ал қалған 5 % брадиаритмиялар мен асистолиялар үлесіне келеді [19–24].

Жаңа буынды жоғары өнімді секвенирлеу технологияларының дамуы аритмиялар дамуымен ассоциацияланған көптеген генетикалық вариацияларды зерттеуге мүмкіндік береді. Адам геномының толық ұзындығы 3,2 млрд жұп негізден тұрады, геномның ~1 % экзомды (ақуыз кодтайтын гендер) кодтайды, ол шамамен 30000 генді құрайды. Аритмиялардың >65 % анықтау үшін дәстүрлі диагностикалық тестілеуде 1–15 генді пайдалану әдетте жеткілікті.

Жаңа буынды секвенирлеу генетика саласында зертханаларда геномдар тізбектерінің вариациясын тез және экономикалық тиімді жолмен анықтауға мүмкіндік береді. Жаңа буынды секвенирлеу көмегімен нақты аурулармен байланысты генетикалық өзгерістерді анықтау үшін геномның нақты таргетті аймақтарын таңдап алу өте маңызды.

«Agilent Technologies» компаниясының гендер панельдері — нақты қосымшаларға арналған нақты гендер жиынтығына шоғырланған құрылғылар. Алдын ала таңдалған контенті бар гендер панельдерін немесе жеке тапсырыс бойынша дайындалған гендер панельдерін сатып алуға болады. Алдын ала таңдалған таргетті гендер панельдерінің құрамына жарияланымдар мен сарапшы нұсқауларынан таңдалып алынған маңызды гендер/ген аймақтары кіреді. Аталған гендер панельдері ісік, тұқымқуалайтын, жүрек-қантамыр ауруларын және аутизмді зерттеуге қолжетімді. Ал пайдаланушы таргетті гендер панельдеріне зерттеушілер өздері нақты зерттеу қызығушылықтарымен байланысты геном аймақтарын таңдай алады. Пайдаланушы таргетті секвенирлеу белгілі бір жолдардағы немесе кең ауқымды геном зерттеулерінен (GWAS)/толық геномды секвенирлеуден кейінгі ізденіс жұмыстарында гендерді зерттеуде қолданылады.

Қазіргі кезде «Agilent Technologies» компаниясы алдын ала таңдалған контенті бар екі кардиогенетикалық панелін ұсынады — HaloPlex кардиомиопатия (HaloPlex Cardiomyopathy) және HaloPlex аритмия (HaloPlex Arrhythmia). HaloPlex кардиомиопатия және HaloPlex аритмия панельдері жаңа буынды секвенирлеу платформаларында секвенирлеуге арналған таргетті тізбектерді байытатын гендер панельдері болып табылады. Аталған панельдер — сәйкесінше кардиомиопатия мен аритмиялардың тұқымқуалайтын формаларына арнайы әзірленген гендер панельдері.

Кардиомиопатиялар бойынша жарық көрген жариялынымдардың мұқият талдау мен NIH ғаламтор-ресурсындағы GeneReviews-тен алынған ақпараттан кейін HaloPlex кардиомиопатия панеліне гипертрофиялық кардиомиопатия, дилатациялық кардиомиопатия және оң қарыншаның аритмогенді кардиомиопатиясымен байланысты 34 ген кіреді. HaloPlex аритмия панеліне ұзартылған QT интервалының синдромы, қысқа QT интервалының синдромы, Бругада синдромы және катехоламинергиялық полиморфты қарыншалық тахикардиямен ассоциацияланған 21 ген кіреді. Кардиомиопатия мен аритмиялардың әртүрлі типтерімен байланысты кейбір гендерде айтарлықтай сәйкестік бар. Дәстүрлік Сэнгер бойынша гендерді секвенирлеумен салыстырғанда панельдер көмегімен клиникалық үлгілердің барлық гендерін бір уақытта жаңа буынды секвенирлеу платформасында бір экономикалық тиімді іске қосуда секвенирлеуге болады [25, 26]. Бірақ аталған зерттеу панельдері жүрек ритмінің зақымдалуына әкелетін барлық гендерді ескермейді. Сондықтан біз Медициналық зерттеулер орталығының (Австрия) қызметкерлерімен бірлесе отырып, аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 генді таргетті байыту әдісімен Таргетті секвенирлеуге арналған жаңа пайдаланушы кардиогенетикалық панелін SureDesign Online Design Software («Agilent Technologies») онлайн-бағдарламасы көмегімен әзірледік. Дайындалған панель құрамына «Agilent Technologies» компаниясымен алдын ала әзірленген панельдер — HaloPlex Кардиомиопатия (HaloPlex Cardiomyopathy) және HaloPlex Аритмия (HaloPlex Arrhythmia) құрамындағы сәйкесінше кардиомиопатия мен аритмиялардың тұқымқуалайтын формаларына жауап беретін 34 және 21 геннен басқа [27], әдебиеттік шолу және ESP6500, 1000 Genomes, NapMap т.с.с. мәліметтер базасы негізінде әртүрлі аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 41 ген кірді.

*Жұмыстың мақсаты.* Аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 геннен тұратын әзірленген жаңа кардиогенетикалық панелі көмегімен аритмогендік синдромдары (атривентрикулярлық блокада, әлсіз синус түйін синдромы) бар 65 науқастың ДНҚ үлгілеріне HiSeq2000 платформасында секвенирлеуге арналған ДНҚ кітапханаларын дайындау.

#### *Зерттеу материалдары мен әдістері*

Ұлттық ғылыми кардиохирургиялық орталық базасында (Астана қ.) зерттеу жұмыстары аясында генетикалық талдауға аритмогендік синдромдары (атривентрикулярлық блокада, әлсіз синус түйін синдромы) бар 65 науқас ақпараттық келісім формасымен танысып, оған қол қойғаннан кейін қатыстырылды. Әрбір науқастың клиникалық мәліметтері — диагнозы, ауру түрі, қосалқы аурулар, алып жатқан емі, емдеу нәтижелері, алынған терапия тарихы, эпидемиологиялық мәліметтері және т.б. жиналды.

Зерттеу хаттамасы, ақпараттық келісім және рекрутингтің барлық түрлері Өмір туралы ғылымдар орталығының Жергілікті этикалық комитетінде (Назарбаев Университеті, Өмір туралы ғылымдар орталығының Этикалық комиссиясының 2015 жылғы 1 наурызындағы отырысы

хаттамасының № 16 үзінді көшірмесі) және Ұлттық ғылыми кардиохирургиялық орталықтың Этикалық комитетінде (Этикалық комитеттің 2015 жылғы 24 ақпанындағы отырыс хаттамасының № 16 үзінді көшірмесі) қарастырылды.

Зерттеу объектілері — адамның геномдық ДНҚ-сы. Геномдық ДНҚ бөліп алу үшін мөлшері 9 мл ЭДТА бар арнайы зарарсыздандырылған вакуунтейнер пробиркаларына (Venosafe) барлық зерттеуге қатысушылардың шынтақ көктамырынан көктамыр қаны алынды.

*ДНҚ бөлу.* Барлық 65 қан үлгісінен Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega) жиынтығының модификацияланған хаттамасы көмегімен геномдық ДНҚ үлгілері бөлінді. Бөлінген ДНҚ үлгілері сапалық (NanoDrop 2000 және 1,5 % агароздық гель) және сандық (Qubit 2000) әдістермен сипатталды. Бөлінген ДНҚ-ң жалпы көлемі — 45  $\mu$ l, 1 микролитрдегі ДНҚ концентрациясы минимум 5 ng/ $\mu$ l құрады.

*Пайдаланушы кардиопанелін дайындау.* Аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 генді таргетті байыту әдісімен Таргетті секвенирлеуге арналған жаңа пайдаланушы кардиогенетикалық панелі Грац қаласының Медицина университеті, Медициналық зерттеулер орталығының (Австрия) қызметкерлерімен бірлесе отырып, әзірленді (патентке өтініш берілді, 2017 жылдың 11 қазанындағы кіріс тіркеу нөмері № 25437). Кардиопанельді дайындауда SureDesign Online Design Software («Agilent Technologies») онлайн бағдарламасы қолданылды. Біз әзірлеген панель құрамына «Agilent Technologies» компаниясымен алдын ала әзірленген панельдер — HaloPlex Кардиомиопатия және HaloPlex Аритмия құрамындағы сәйкесінше кардиомиопатия мен аритмиялардың тұқымқуалайтын формаларына жауап беретін 34 және 21 геннен басқа, әдебиеттік шолу және ESP6500, 1000 Genomes, NapMap т.с.с. мәліметтер базасы негізінде әртүрлі аритмиялармен ассоциацияланған 41 ген кірді. Пайдаланушы кардиопанель дизайні Illumina платформасына арналған Адам геномының 19 нұсқасы (Human Genome version 19 GRCh 37, February 2009) көмегімен құрылды, ридтер ұзындығы — 150 bp. Әзірленген пайдаланушы панельді ILMFST, p/n G9901C каталогтық нөмері бойынша Agilent Technologies компаниясының сайтынан әзірлеушілердің рұқсатымен сатып алуға болады.

*ДНҚ кітапханаларын құру.* Таргетті гендер кітапханалары әзірленген HaloPlex Custom Tier 1 kit, «Agilent Technologies» (ILMFST, p/n G9901C) жиынтығы көмегімен 10 кезеңнен тұратын «HaloPlex Target Enrichment System for Illumina Sequencing» (D.3 нұсқасы, желтоқсан 2012) хаттамасына сәйкес 65 ДНҚ үлгіге дайындалды. Хаттама 225 ng геномдық ДНҚ-ны қорытуға оңтайландырылған. Бақылау ретінде жиынтық құрамындағы байытылған бақылау ДНҚ (Enrichment Control DNA, ECD) пайдаланылды. Барлық 65 ДНҚ үлгілерінің сандық және сапалық талдауы сәйкесінше Qubit 2.0 (Life Technologies, Сингапур) флуориметрі және 2 % агароздық гель көмегімен өткізілді. Таргетті гендер кітапханаларын дайындау екі түрлі аймақта өткізілді: ДНҚ үлгілерін байыту үрдісі преамплификация аймағында өткізілсе, амплификациялаған, байытылған ДНҚ үлгілерімен кейінгі тәжірибелер пост-амплификациялық жұмыс аймағында орындалды.

#### *Зерттеу нәтижелері және оларды талдау*

*Зерттеуге қатысушылардың клиникалық мәліметтері.* Зерттеу жұмысына Ұлттық ғылыми кардиохирургиялық орталығында емделіп жатқан жүрек ритмінің зақымданулары бар (атривентрикулярлық блокада, әлсіз синус түйін синдромы) 65 науқас кірді. Науқастардың жасы 4 пен 81 жас аралығында болды, олардың ішінде 16 науқастың жасы 18 жастан төмен болды. Ерлер мен әйелдердің ара қатынасы сәйкесінше 44,3 % және 55,7 % құрады. Науқастардың көбісінің ұлты қазақ — 70,1 %, орыстар — 13,4 %, басқа ұлттар — 16,5 %.

87,6 % науқастарға электркардиостимулятор имплантталды. Сол қарынша шығарылулары фракциясының орташа көрсеткіші — 61,2 %. Барлық науқастардың ішінде 96,9 % жағдайда жүрек өткізгіштігінің зақымдануларына тән жиі жүрек соғу, әлсіздік, енгіту, бас айналу, жүрек аймағындағы қақсау және т.б белгілер байқалды. 37,1 % науқастар анемнезінде синкоп немесе пресинкоп жағдайлары болды.

Зерттеуге қатысушылардың жанұялық анамнезі бойынша ақпаратты жинау барысында 25,8 % науқастың бір немесе екі ата-анасында жүрек қантамыр жүйесінің аурулары, атап айтқанда, артериалды гипертензия, жүректің ишемиялық ауруы, инсульт және т.б анықталды. Екі науқаста ата-аналарының біреуінде ритм немесе жүрек өткізгіштік (жүрекше фибрилляциясы, әлсіз синус түйін синдромы) зақымдануларының тұқымқуалаушылық формасы көрсетілген. Үш жағдайда науқастардың жанұя анемнезінде ата-аналарының біреуінде кенеттен жүрек өлімі тіркелген.

*Әзірленген пайдаланушы кардиопанель көмегімен ДНҚ кітапханаларын әзірлеу.* Зерттеу жұмысының нәтижесінде таргетті гендер кітапханалары аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 генді секвенирлеуге арналған әзірленген пайдаланушы кардиогенетикалық панель көмегімен 65 ДНҚ үлгіге өндіруші хаттамасына сәйкес дайындалды.

Алғашқы кезеңде нуклеазалардан тазартылған 45  $\mu$ l суда әрбір 225 ng геномдық ДНҚ үлгілері ерітілді, ДНҚ-ң ақырғы концентрациясы 5 ng/ $\mu$ l құрады. Содан кейін геномдық ДНҚ үлгілері сегіз әр түрлі рестрикциялық пробиркаларда 16 түрлі ферменттермен ұзындығы әртүрлі фрагменттерге 37 °C температурада 30 мин ішінде кесілді. Жиынтықтағы байытылған бақылау ДНҚ (Enrichment Control DNA, Agilent Technologies, США) бақылау ретінде қолданылды, фрагментация нәтижелері 2100 Bioanalyzer биоанализаторында тексерілді.

Геномдық ДНҚ фрагменттерінің коллекциясы мен зондтардың гибридизациясы гибридизациялық мастер миксте 54 °C температурада 3 сағат ішінде өткізілді. Гибридизациялық қоспа құрамына 50  $\mu$ l гибридизациялық ерітінді мен 20  $\mu$ l зонд кірді. Осы кезеңде ДНҚ сақиналы молекулаларын құру үшін зондтар кітапханасы таргетті фрагменттердің екі ұшына гибридизацияланды. Сонымен қатар келешекте үлгілерді биоақпараттық талдау кезінде идентификациялау үшін гибридизация үрдісі кезінде 65 ДНҚ үлгісіне (таргетті аймақтарға) 65 түрлі индекс сиквенстері қосылды. Нәтижесінде, біз құрамына баркод (индекс сиквенстері) және сиквенс арнайы адапторлар кіретін таргетті ДНҚ-ң биотинделген циркуляцияланған фрагменттерін алдық.

Үшінші кезеңде құрамында биотин бар циркуляцияланған таргетті ДНҚ-зонд гибридтер магнитті стрептавидин шарларында ұсталды. Алдымен, магнитті шарлар 40  $\mu$ l Capture solution ерітіндісінде ресуспензияланды және 160  $\mu$ l гибридизациялық реакцияға қосылды. Содан кейін зондқа гибридизацияланбаған ДНҚ фрагменттерін жою үшін магнитті шарлармен байланысқан үлгілерді 100  $\mu$ l Wash solution ерітіндісінде жудық және термоциклдерде (Eppendorf, США) 46 °C температурада 10 минут ішінде инкубацияладық. Сонымен қатар алтыншы кезеңде пайдаланылатын 10N NaOH концентрациясынан 50 mM NaOH ерітіндісін дайындадық.

Төртінші кезеңде таргетті ДНҚ-зондтар циркуляцияланған гибридтерді біріктіру үшін ұстау реакциясына ДНҚ-лигаза қосылды. Үлгілері бар пробиркалар термоциклдерде 55 °C температурада 10 минут ішінде лигациялау үшін инкубацияланды.

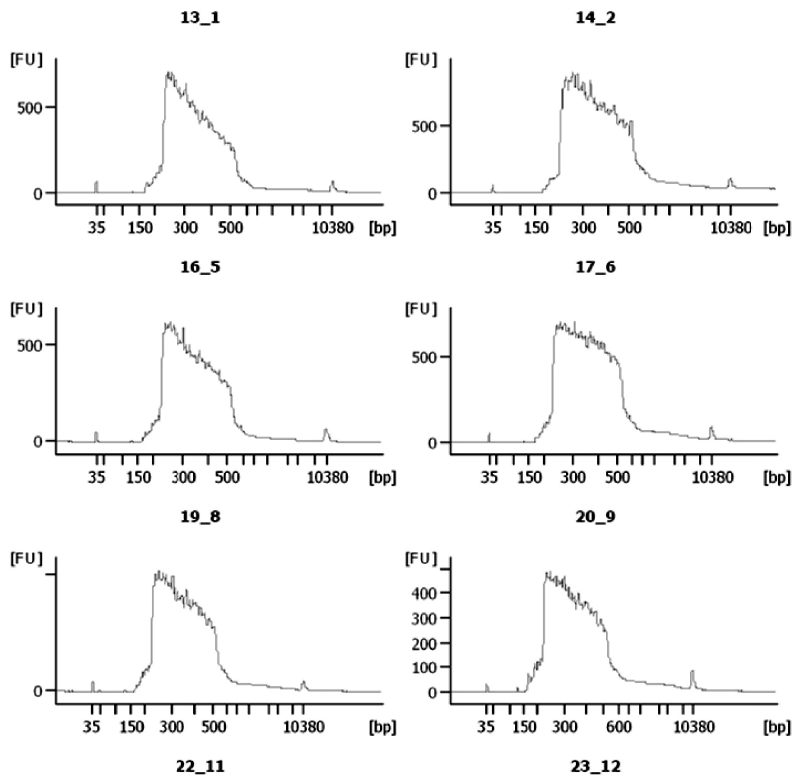
Бесінші кезеңде ұсталған таргетті ДНҚ амплификациясына арналған ПТР мастер миксін өндіруші (Agilent Technologies, США) хаттамасына сәйкес дайындадық. Келесі кезеңде элюция кезінде қолданылатын NaOH ерітіндісін нейтрализациялау үшін ПТР реакциясына 2M сірке қышқылын қостық.

Алтыншы кезеңде лигацияланбаған циркуляцияланған зонд-таргетті ДНҚ гибридтерін жою үшін ұсталған ДНҚ кітапханаларын 100  $\mu$ l SSC Buffer ерітіндісінде жудық. Содан кейін ұсталған ДНҚ кітапханалары 25  $\mu$ l жаңа дайындалған 50 mM NaOH ерітіндісінде элюирленді. Осы кезеңде жоғары сапалы NaOH ерітіндісін пайдалану ДНҚ-ны оңтайлы жуу және қалпына келтіруде өте маңызды болып табылады.

Келесі кезеңде ұсталған таргетті кітапханалардың ПТР-амплификациясы өткізілді. Яғни, 50 mM NaOH ерітіндісімен жуылған 20  $\mu$ l ұсталған ДНҚ-ны 5-кезеңде дайындаған 30  $\mu$ l ПТР мастер миксіне қостық. Ұсталған таргетті ДНҚ кітапханаларының ПТР-амплификациясы 60 °C аннилинг температурасында өткізілді, циклдер саны — 20.

Сегізінші кезеңде амплификацияланған таргетті ДНҚ кітапханалары Agencourt AMPure XP (Beckman, США) шарлары көмегімен тазаланды. Алдымен, адаптерлер сияқты, кішкентай ДНҚ фрагменттерін жою үшін шарлардағы амплификацияланған таргетті ДНҚ кітапханаларын 70 % жаңа дайындалған этанолмен 4 рет жудық, содан кейін амплификацияланған таргетті кітапханаларды 10 mM Tris-HCl ерітіндісімен жуылды.

Тоғызыншы кезеңде ДНҚ кітапханаларының саны мен сапасы 2100 Bioanalyzer биоанализаторында (Agilent Technologies, США) бағаланды. Ампликондар ұзындығы 175–625 bp диапазонында болды, күтілгендей, өнімдердің көбісінің ұзындығы 225–525 bp құрады (сур. қара). Байытылған таргетті ДНҚ кітапханаларының сандық бағасын өткізу үшін ампликондардың 175–625 bp диапазонындағы мөлшері кірді. Дайындалған ДНҚ кітапханаларының орташа концентрациясы 90 ng/ $\mu$ l құрады.



Сурет. 2100 Bioanalyzer биоанализаторындағы сапасы жақсы ДНҚ-кітапханалары

Соңғы кезеңде әртүрлі индекстері мен эквиволярлы саны (биоанализатор көмегімен алынған ДНҚ кітапханалардың концентрациясы) бар үлгілер HiSeq2000 платформасында мультиплексті секвенирлену үшін біріктірілді.

Қорыта келгенде, құрамына аритмогендік синдромдармен ассоциацияланған 96 ген кіретін таргетті секвенирлеуге арналған жаңа пайдаланушы кардиогенетикалық панелі көмегімен 65 ДНҚ кітапханалары дайындалды. Таргетті гендер кітапханаларын дайындау үшін, ең алдымен, ДНҚ үлгілері 16 түрлі рестрикциялық ферменттермен фрагменттерге бөлінді және денатурацияланды. Содан кейін сақиналы ДНҚ молекулаларын құру үшін зондтар кітапханасы таргетті фрагменттердің екі ұшына гибридизацияланды. 65 индекс сиквенстері 65 үлгіге қосылды. HaloPlex зондтар биотинделді және таргетті фрагменттер магнитті стрептавидинді шарлармен ұсталды. ДНҚ сақиналы молекулалары лигация реакциясында біріктірілді. Кейін таргетті фрагменттер амплификацияланды. Нәтижесінде, секвенирлеуге дайын байытылған және индекстелген амплификация өнімдері құрылды. Барлық үлгілер HiSeq2000 жаңа буынды секвенирлеу платформасында секвенирленді. Қазіргі кезде алынған секвенирлеу мәліметтерінің биоақпараттық талдауы өткізілуде.

Келешекте арнайы гендердегі мутацияларды бағалауды диагнозды түзетуде және емдеудің дербес әдісінде пайдалануға болады. Зерттеу барысында табылған патологиялық мутациялар анықталғаннан кейін, науқасқа оның жақын туыстарының скринингі ұсынылады. Алынған нәтижелер олардың жанұяларындағы кейінгі алдын алу іс-шараларды өзгертуі мүмкін.

*Зерттеу жұмысы 2015–2017 жж. арналған ҚР БҒМ 0072/БТҚ «Қазақстанда геномдық медицина негіздерін құру және дамыту» бюджеттік бағдарламасы бойынша «Жүрек аритмияларына генетикалық бейімділікті анықтау және олардың диагностикасына арналған HaloPlex кардиогенетикалық панелін әзірлеу және клиникалық апробациялау» жобасы аясында өткізілді.*

#### Әдебиеттер тізімі

1 Martin C.A. Recent developments in the management of patients at risk for sudden cardiac death / C.A. Martin, C.L. Huang, G.D. Matthews // Postgraduate Medicine. — 2011. — No. 123(2). — P. 84–94.

- 2 Keating M.T. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias / M.T. Keating, M.C. Sanguinetti // *Cell*. — 2001. — Vol. 104. — P. 569–580.
- 3 Corrado D. Sudden cardiac death in young people with apparently normal heart / D. Corrado, C. Basso, G. Thiene // *Cardiovascular Research*. — 2001. — Vol. 50. — P. 399–408.
- 4 Puranik R. Sudden death in the young / R. Puranik, C.K. Chow, J.A. Duflou, M.J. Kilborn, M.A. McGuire // *Heart Rhythm*. — 2005. — Vol. 2. — P. 1277–1282.
- 5 More D. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia in the elderly / D. More, K. O'Brien, J. Shaw // *Pacing Clin. Electrophysiol.* — 2002. — Vol. 25. — P. 1266–1269.
- 6 Aronow W.S. Prevalence and association of ventricular tachycardia and complex ventricular arrhythmias with new coronary events in older men and women with and without cardiovascular disease/ W.S. Aronow, C. Ahn, A.D. Mercado, S. Epstein, I. Kronzon // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* — 2002. — Vol. 57. — P. 78–80.
- 7 Maron B.J. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review/ B.J. Maron // *JAMA*. — 2002. — Vol. 287. — P. 1308–1320.
- 8 Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / G. Thiene, D. Corrado, C. Basso // *Orphanet J. Rare Dis.* — 2007. — No. 2. — P. 45.
- 9 Ghai A. Left ventricular dysfunction is a risk factor for sudden cardiac death in adults late after repair of tetralogy of Fallot / A. Ghai, C. Silversides, L. Harris, G.D. Webb, S.C. Siu, J. Therrien // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 1675.
- 10 Roden D.M. American Heart Association. Cardiovascular genetics and genomics / D.M. Roden. — Chichester: Wiley-Blackwell, 2009.
- 11 Ho C.Y. Genetics and clinical destiny: Improving care in hypertrophic cardiomyopathy / C.Y. Ho // *Circulation*. — 2010. — Vol. 122. — No. 2430 — P. 40.
- 12 Wang L. Narrative review: Harnessing molecular genetics for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy / L. Wang, J.G. Seidman, C.E. Seidman // *Ann. Intern. Med.* — 2010. — Vol. 52. — No. 513. — P. 20.
- 13 Olivetto I. Myofibrillar protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy / I. Olivetto, F. Girolami, M.J. Ackerman et al. // *Mayo Clin. Proc.* — 2008. — No. 83. — P. 80.
- 14 Bonora E. The metabolic syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona diabetes complications study/ E. Bonora, G. Targher, F. Formentini et al. // *Diabetic Med.* — 2002. — No. 21. — P. 52–58.
- 15 Pastors J.G. The evidence for the effectiveness of medical nutrition therapy in diabetes management / J.G. Pastors, H. Warshaw, H. Daly et al. // *Diabetes Care*. — 2002. — No. 25. — P. 608–613.
- 16 Sigal R.J. Physical activity/exercise and type 2 diabetes/ R.J. Sigal, G.P. Kenny, D.H. Wasserman et al. // *Diabetes Care*. — 2004. — No. 27. — P. 25–39.
- 17 Franz M.J. Evidence based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications / M.J. Franz, J.P. Bantle, C.A. Beebe et al. // *Diabetes care*. — 2002. — No. 25. — P. 148–298.
- 18 Marban E. Cardiac channelopathies / E. Marban // *Nature*. — 2002. — Vol. 415. — P. 213–218.
- 19 Priori S.G. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia / S.G. Priori, C. Napolitano, N. Tiso, M. Memmi, G. Vignati, R. Bloise, V. Sorrentino, G.A. Danieli // *Circulation*. — 2001. — Vol. 103. — P. 196–200.
- 20 Tiso N. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2) / N.Tiso, D.A. Stephan, A. Nava, A. Bagattin, J.M. Devaney, F. Stanchi, G. Larderet, B. Brahmabhatt, K. Brown, B. Bauce, M. Muriago, C. Basso, G. Thiene, G.A. Danieli, A. Rampazzo // *Hum Mol Genet.* — 2001. — Vol. 10. — P. 189–194.
- 21 Splawski I. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2/ I. Splawski, J. Shen, K.W. Timothy, M.H. Lehmann, S. Priori, J.L. Robinson, A.J. Moss, P.J. Schwartz, J.A. Towbin, G.M. Vincent, M.T. Keating // *Circulation*. — 2000. — Vol. 102. — P. 1178–1185.
- 22 Chen Q. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation / Q. Chen, G.E. Kirsch, D. Zhang, R. Brugada, J. Brugada, P. Brugada, D. Potenza, A. Moya, M. Borggrefe, G. Breithardt et al. // *Nature*. — 1998. — Vol. 392. — P. 293–296.
- 23 Bauce B. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers / B. Bauce, A. Rampazzo, C. Basso, A. Bagattin, L. Daliento, N. Tiso, P. Turrini, G. Thiene, G.A. Danieli, A. Nava // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2002. — Vol. 40. — P. 341–349.
- 24 Laitinen P.J. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia / P.J. Laitinen, K.M. Brown, K. Piippo, H. Swan, J.M. Devaney, B. Brahmabhatt, E.A. Donarum, M. Marino, N. Tiso, M. Viitasalo, L. Toivonen, D.A. Stephan, K. Kontula // *Circulation*. — 2001. — Vol. 103. — P. 485–490.
- 25 Wilson K.D. A rapid, high quality, cost-effective, comprehensive and expandable targeted next generation sequencing assay for inherited heart disease / K.D. Wilson, P. Shen, E. Fung, I. Karakikes, A. Zhang, K. InanlooRahatloo, J. Odegaard, K. Sallam, R.W. Davis, G.K. Lui, E.A. Ashley, C. Scharfe, J.C. Wu // *New methods in Cardiovascular Biology*. — 2015. — Vol. 117. — P. 603–611. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306723.
- 26 Green A. Assessment of HaloPlex amplification for sequence capture and massively parallel sequencing of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy associated genes/ A. Green, H. Green, M. Rehnberg, C. Svensson, C. Gunnarsson, J. Jonasson // *The Journal of Molecular Diagnostics*. — 2015. — Vol. 17. — P. 31–42. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.09.006](http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2014.09.006).
- 27 Retrieved from <http://www.chem.agilent.com/library/datasheets/Public/HaloPlexCardiomyopathyandArrhythmiaPanels DataSheet59912525EN.pdf>.

А.Ж. Ахметова, Ж.М. Абилова, С.Е. Рахимова, У.Е. Каиров,  
М.С. Бекбосынова, Ч. Гули, А.Р. Акильжанова

### **Особенности подготовки библиотек для таргетного секвенирования при аритмогенных синдромах**

В статье подробно описана методика подготовки ДНК библиотек для таргетного секвенирования 96 генов, ассоциированных с аритмогенными синдромами методом таргетного обогащения с использованием разработанной пользовательской кардиогенетической панели для платформы Illumina. ДНК библиотеки таргетных генов были подготовлены для 65 пациентов с различными аритмогенными синдромами. Протокол был оптимизирован для усвоения 225 нг геномной ДНК. В качестве контроля была использована обогащенная контрольная ДНК (Enrichment Control DNA), поставляемая вместе с набором p/n G9901C (Agilent Technologies, США). Сначала образцы ДНК всех пациентов были поделены на фрагменты рестрикционными ферментами и денатурированы. Затем библиотека зондов была гибридизирована к таргетным фрагментам для создания кольцевых молекул ДНК. В дальнейшем для идентификации образцов во время биоинформатического анализа 65 индекс-сиквенсов были добавлены к 65 образцам. Зонды были биотинилированы, и целевые фрагменты отделены с помощью магнитных стрептавидиновых шариков. Кольцевые молекулы ДНК были соединены лигированием. Таргетные фрагменты были амплифицированы с помощью ПЦР, в итоге создавая индексированные продукты амплификации, которые были отправлены для дальнейшего секвенирования на секвенаторе нового поколения HiSeq2000.

*Ключевые слова:* аритмогенные синдромы, таргетное секвенирование, библиотеки ДНК, современная кардиология.

A.Zh. Akhmetova, Zh.M. Abilova, S.E. Rakhimova, U.E. Kairov,  
M.S. Bekbosynova, Ch. Guelly, A.R. Akilzhanova

### **Features of library preparation for targeted sequencing of arrhythmogenic syndromes**

In this article methodology of preparation of DNA libraries for targeted sequencing of 96 genes associated with arrhythmogenic syndromes by targeted enrichment method using developed custom cardiogenetic panel for Illumina platform was described in details. DNA libraries of targeted genes were prepared for 65 patients with different arrhythmogenic syndromes. The protocol was optimized for digestion of 225 ng of genomic DNA. Enrichment Control DNA supplied with p/n G9901C (Agilent Technologies, USA) set was used as a control. Firstly, DNA samples of all patients were fragmented by restriction enzymes and denaturated. Then, probe library was hybridized to targeted fragments for creation of circular DNA molecules. To identify samples during bioinformatics analysis 65 different index sequences were added to 65 samples. Probes were biotinylated and targeted fragments were recaptured with magnetic streptavidin beads. Circular DNA molecules were joined together by ligation. Targeted fragments were amplified using PCR producing an enriched and barcoded amplification products that were sent for sequencing on HiSeq2000.

*Keywords:* arrhythmogenic syndromes, targeted sequencing, DNA libraries, modern cardiology.