

На правах рукописи

КОСТАРЕВА
Анна Александровна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ
ИДИОПАТИЧЕСКОЙ РЕСТРИКТИВНОЙ
КАРДИОМИОПАТИИ**

14.01.05 – кардиология
03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

Шляхто Евгений Владимирович - доктор медицинских наук, профессор, академик РАН
Thomas Sejersen- MD, PhD, профессор (Karolinska Institutet)

Официальные оппоненты:

Каплунова Вера Юрьевна - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра госпитальной терапии N1 Института клинической медицины, доцент кафедры;

Затейщиков Дмитрий Александрович - доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ «Городская клиническая больница N 51 департамента здравоохранения г. Москвы» первичное сосудистое отделение, заведующий;

Захарова Екатерина Юрьевна - доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», лаборатория наследственных болезней обмена веществ, заведующая лабораторией.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук».

Защита состоится « ____ » _____ 201 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д 208.054.04 на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт–Петербург, ул. Аккуратова, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России (197341, Санкт–Петербург, ул. Аккуратова, д.2), www.almazovcentre.ru

Автореферат разослан « ____ » _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 208.054.04
доктор медицинских наук, профессор

Недошивин Александр Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Кардиомиопатии (КМП) являются одними из наименее изученных и понимаемых заболеваний миокарда, несмотря на большое количество работ, ведущихся в этой области. Трудности в изучении этой группы заболеваний были связаны с относительной редкостью данной патологии, сложностью визуализации морфологических изменений миокарда и большой значимостью высокотехнологичных инструментальных методов исследования в диагностике этой патологии. С внедрением в широкую клиническую практику метода эхокардиографии, доступностью МРТ, возможностью проведения на новом уровне молекулярно-биологических исследований, наряду с появлением новых компьютеризированных информационных технологий, был достигнут существенный прогресс в изучении кардиомиопатий. В понимании этиопатогенеза именно этой группы заболеваний в течение последних 10-15 лет произошли наиболее значимые изменения, что нашло отражение в существующих классификациях и определении.

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) характеризуется наличием рестриктивного фенотипа по данным ЭхоКГ в сочетании с нормальным или незначительно уменьшенным размером одного или обоих желудочков, нормальной или почти нормальной систолической функцией и нормальной или незначительно увеличенной толщиной стенок левого желудочка (Muchir A., 2009; Richardson P., 1996). РКМП является не самостоятельным заболеванием, а описательно-морфологическим термином, характеризующим множество возможных патологических состояний с поражением миокарда в качестве ведущего или одного из симптомов. Часто РКМП носит наследственный генетически-обусловленный характер, при этом заболевание может являться частью более сложных наследственных синдромов с вовлечением многих систем и органов (Вайханская Т.Г., 2017; Попова, Е.Н., 2018; Третьяков А.Ю., 2018). Нередко генетически обусловленные РКМП сочетаются с нейромышечными заболеваниями, при этом кардиальный фенотип может быть ведущим в клинической картине, а поражение периферических мышц субклиническим (десминопатии, ламинопатии) (Araujo-Vilar D., 2008; Mercuri E., 2005; van Spaendonck-Zwarts K., 2011). РКМП может являться одним из проявлений болезней накопления и инфильтративных заболеваний, например, болезни Гоше, болезни Фабри, гемохроматоза, болезни Помпе, болезни Неймана-Пика, а также частью наследственного кардиофациального синдрома Нунана или генетически обусловленных форм амилоидоза (Леонтьева И.В., 2008; Мельник О. В., 2017). Дифференциальная диагностика рестриктивного фенотипа сложна и требует проведения большого количества специальных диагностических тестов и процедур.

Расширение спектра генетических причин идиопатической РКМП позволило предполагать, что полиморфные варианты ряда генов могут являться факторами, ассоциированными с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока при ХСН и ненаследственного генеза. Исследованию

генетических детерминант, ассоциированных с развитием диастолической дисфункции миокарда и СНсФВ при мультифакторных заболеваниях сердечно-сосудистой системы – гипертонической болезни, ИБС, диабетической кардиопатии - посвящено ограниченное количество работ, в то время как ассоциация определенных генетических детерминант с развитием СНсФВ неоднократно была продемонстрирована. Поскольку наличие рестриктивного типа кровенаполнения ЛЖ при СНсФВ является фактором неблагоприятного прогноза и определяет темпы прогрессирования атриомегалии и риск развития наджелудочковых нарушений ритма у пациентов с ХСН приобретенного генеза, выявление генетических детерминант, определяющих развитие рестриктивного типа ремоделирования и диастолической дисфункции является актуальной научной и клинической задачей.

В настоящее время определение генетических дефектов, лежащих в основе развития кардиомиопатий внедряется в клиническую практику с целью генетического консультирования, пренатальной диагностики и ранней постановки диагноза бессимптомным носителям мутаций (Суркова Е.И., 2018; Naas J., 2015; Lopes L., 2015). Однако, попытки провести корреляции между генотипом и фенотипическими проявлениями мутации и прогнозом заболевания не привели к значительным результатам. Поэтому использование данных генетического анализа в клинической практике все еще является ограниченным и не позволяет развивать подходы персонализированной терапии. В настоящее время в научную и клиническую практику внедряется секвенирование нового поколения (массовое параллельное секвенирование), которое позволяет одновременно скринировать сотни генов и идентифицировать множество причинных мутаций и ассоциированных генетических вариантов. Появление высокотехнологичных методов секвенирования и описание комплексных генетических дефектов позволило выявлять общие, универсальные внутриклеточные процессы, обуславливающие развитие того или иного типа дисфункции кардиомиоцитов и миоцитов. Результатом данных исследований должно явиться определение новых внутриклеточных мишеней, которые, как, например, при нейромышечной патологии, могут стать основой для персонализированной терапии данной тяжелой группы заболеваний.

Степень разработанности проблемы

Поскольку РКМП является одной из наиболее редких форм кардиомиопатий, а идиопатическая ее форма диагностируется крайне редко, изучение спектра генетических причин данной формы кардиомиопатий до настоящего времени было затруднено. Наибольшей когортой больных с охарактеризованной генетической природой заболевания на сегодняшний момент является группа больных из исследования Elliott P. и соавторов, в которой исследование мутаций только саркомерных генов (*MYH7*, *ACTC*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*) было проведено в группе из 12 человек (Kaski J., 2008). При этом данных о распространенности дефектов генов белков цитоскелета и ядерной оболочки, а также об особенностях генетических детерминант рестриктивной кардиомиопатии в разных возрастных группах в настоящий

момент в литературе не существует. Поэтому актуальность проведения данного исследования с применением массового параллельного секвенирования - наиболее современного метода генетического анализа – в группах больных с дебютом заболевания в разных возрастных группах представляется несомненной. В настоящее время существует лишь ограниченное таких работ в данной области, однако их число будет нарастать в течение следующих 3-5 лет. Все вышесказанное и предопределило постановку следующей цели исследования.

Цель исследования

Установить особенности клинического течения, спектр генетических причин и молекулярные механизмы патогенеза идиопатической рестриктивной кардиомиопатии для выявления факторов риска при различных клинико-генетических вариантах заболевания и обоснования оптимальной врачебной тактики.

Задачи исследования

1. С помощью технологии секвенирования нового поколения охарактеризовать спектр генетических причин, приводящих к развитию идиопатической рестриктивной кардиомиопатии.
2. На основании клинических данных и функциональных методов исследования определить особенности клинического течения, спектр нарушений ритма сердца, динамику ремоделирования миокарда и развития сердечной недостаточности у больных с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в зависимости от генетической причины заболевания.
3. Выявить особенности клинического течения и генетической природы заболевания у пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией с дебютом заболевания в детском возрасте.
4. Установить особенности клинического течения заболевания и спектр генетических причин в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в сочетании с нейромышечной патологией.
5. Оценить возможность использования различных шкал расчета прогноза течения хронической сердечной недостаточности в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией.
6. В моделях *in vitro* изучить молекулярно-генетические механизмы развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене десмина.
7. С использованием клеточных моделей исследовать молекулярно-генетические механизмы патогенеза кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена ламина А/С.
8. На молекулярном уровне *in vitro* проанализировать нарушения функции саркомера, возникающие вследствие мутаций в гене тропонина I, ассоциированных с развитием идиопатической рестриктивной кардиомиопатией.
9. Выявить генетические детерминанты, ассоциированные с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного фенотипа, в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью, развившейся на

фоне гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и/или ожирения.

Научная новизна исследования

Получены новые данные о спектре генетических причин, приводящих к развитию идиопатической рестриктивной кардиомиопатии. С учетом редкости исследуемой патологии и спектра изученных генов данная выборка является наибольшей генетически-охарактеризованной группой РКМП из всех представленных в научной литературе. Описаны новые особенности клинического течения и прогноза заболевания у пациентов идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в зависимости от генотипа и возраста дебюта заболевания. Продемонстрирована потенциальная возможность использования шкал определения прогноза ХСН в группе пациентов с идиопатической РКМП. Показано ведущее значение ФП как фактора, определяющего прогноза пациентов с идиопатической РКМП.

На основании проведенных исследований с использованием подходов массового параллельного секвенирования получены новые данные о генетических причинах РКМП, ассоциированной с нейромышечной патологией, а также впервые описана клиническая форма РКМП с ранним дебютом заболевания в сочетании с врожденной миопатией на фоне мутаций гена филамина С (*FLNC*). Продемонстрирована ведущая роль мутаций в гене *FLNC* среди причин развития РКМП. Идентифицированы новые генетические маркеры – полиморфные варианты генов *MADD* и *RBM20*, ассоциированные с диастолической дисфункцией, концентрической гипертрофией миокарда и сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса.

Получены новые данные о влиянии мутаций гена десмина на функцию клеточного дыхания, митохондриальный захват кальция и продукцию АТФ. Впервые показано влияние мутаций гена ламина на дифференцировку стромальных мультипотентных клеток-предшественников в миогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, а также продемонстрировано нарушение эпигенетической регуляции стромальных стволовых клеток под влиянием мутаций в гене ламина. Раскрыты новые молекулярно-генетические механизмы влияния мутаций R170G и R170W в гене тропонина I на чувствительность сократительных миофиламентов к ионам кальция и показана роль белка MYBPC3 в реализации эффекта данных мутаций.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Представленные клиничко-генетические корреляции течения РКМП в детской и взрослой группах пациентов могут быть использованы для определения прогноза заболевания и показаний для проведения медико-генетического консультирования. Описанная впервые клиническая форма РКМП в сочетании с врожденной миопатией расширяет спектр известных на сегодняшний момент форм филаминопатий и кардиомиопатий с

нейромышечной симптоматикой, что имеет практическое значение для дифференциально-диагностического поиска. С учетом высокой частоты сочетания идиопатической РКМП с нейромышечными заболеваниями (29%), в работе обоснована целесообразность проведения расширенного неврологического обследования пациентов с оценкой функции скелетной мускулатуры. Выявленный высокий риск развития синдрома ВС в группе пациентов с идиопатической РКМП, ассоциированной с мутациями в генах белков саркомера, обосновывает необходимость разработки специальных показаний для имплантации кардиовертера-дефибриллятора в данной группе пациентов. Предложена схема генетической диагностики у пациентов с идиопатической РКМП и обоснованы показания к ее использованию и принципы ее применения. Выявленные новые молекулярные и клеточные механизмы развития рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутациями в генах десмина, ламина и тропонина, имеют существенное значение для расширения представлений о патогенезе генетически-обусловленных форм кардиомиопатий. Определение генетических детерминант, ассоциированных с развитием сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса в когорте из 380 пациентов, подтверждает значение генетических предикторов гипертрофии миокарда в развитии диастолической дисфункции.

Методология и методы исследования

В исследовании были использованы методы одномоментного анализа и проспективного наблюдения. Формирование когорты пациентов с идиопатической РКМП происходило на основании критериев включения и невключения. Главным критерием включения являлся диагноз идиопатической РКМП, который устанавливался в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и классификацией Европейского общества кардиологов (ESC) 1996 года. В ходе базового клинического обследования проводилась верификация диагноза, исключение приобретенных причин РКМП. Критериями невключения являлись наличие установленных приобретенных причин РКМП, таких как AL-амилоидоз, констриктивный перикардит, карциноид, предшествующее лучевое воздействие. В детскую группу были включены пациенты с РКМП, у которых дебют заболевания состоялся в возрасте до 18 лет. В основную исследуемую группу вошли 35 пациентов с идиопатической РКМП, проходивших обследование и лечение на базе кардиологических отделений и отделений педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», а также клиники Кафедры факультетской терапии с курсом эндокринологии ПСПбГМУ им. академика И. П. Павлова в течение 2001–2018 гг. Определение причинной роли выявленных генетических вариантов проводилось в соответствии с классификацией Американской ассоциации медицинской генетики (ACMG) и рекомендациями Российского общества медицинской генетики. При формировании группы пациентов с ХСН с целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов с развитием рестриктивного фенотипа критерием включения в группу являлось наличие у пациента ХСН в соответствии с критериями Европейского общества

кардиологов 2016 года, развившейся на фоне артериальной гипертензии, факторов кардиометаболического риска, а также ИБС. Критериями невключения в группу являлись: наличие идиопатических форм КМП, наличие КМП, ассоциированных с системными заболеваниями, транстиретиновым и AL-амилоидозом, наличие миокардита, наличие перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), наличие постоянной формы ФП. В анализируемую группу вошло 334 пациента с ХСН. В качестве контрольной группы были обследованы здоровые доноры в возрасте 18–50 лет.

Молекулярно-генетические и клеточные методы исследования

ДНК выделяли из цельной крови с дополнительным этапом обработки РНКазой. Последующую амплификацию для приготовления финальных библиотек перед секвенированием проводили при помощи набора для пробоподготовки Haloplex на приборе MiSeq (Illumina). Экзомное секвенирование проводили при помощи набора для пробоподготовки SureSelect на приборе HiSeq (Illumina). Оценку внутримитохондриального уровня кальция, функции клеточного дыхания в культуре клеток, выделение саркомерных белков, оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы и силы сокращения изолированных миофибрилл проводились в соответствии со стандартными описанными протоколами. Клонирование гена десмина, ламина, филмина и тропонина для последующего их использования с целью генетической модификации клеток и наработки белка, а также направленную дифференцировку сателлитных мышечных клеток, клеток линии C2C12 и ММСК проводили в соответствии со стандартными протоколами.

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки данных ПЦР в реальном времени использовали программу *STATISTICA 10* (StatSoft, Inc.) и GraphPad. В разведывательной и описательной частях статистического анализа применялись процедуры стягивания шага гистограммы, диаграммы Тьюки «ящики с усами», различные совместные диаграммы рассеяния. Нормальность распределения проверялась с помощью тестов Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Данные в результатах представлены в виде среднего значения по всем проведенным экспериментам; в случае нормального распределения данных указаны средние значения и стандартные отклонения (SD) или ошибки среднего (SEM) для каждого проанализированного образца. В случае распределения данных, отличного от нормального, представлены значения медианы и квартилей. Статистическую значимость различий между группами оценивали при помощи критерия Манна-Уитни. Критическим уровнем значимости различия считали $p = 0,05$. При сравнении различных групп больных применялся анализ кривых дожития Каплана-Мейера. Сравнения кривых дожития проводилось по критериям Кокса, Кокса-Мантеля, Log-ранговому критерию.

Основные положения, выносимые на защиту

1. При рестриктивной кардиомиопатии доля пациентов с положительными результатами генотипирования составляет 74%, патогенные и условно-патогенные генетические варианты определяются в генах саркомерных и

цитоскелетных белков, а в 22% случаев причиной развития заболевания является сочетание патогенных вариантов в генах саркомерных белков с вариантами неопределенной значимости в генах белков цитоскелета; наиболее частой причиной развития генетически обусловленной рестриктивной кардиомиопатии являются мутации в гене *FLNC*, составляющие 20%.

2. Генотип пациента с причинными вариантами в генах саркомерных белков ассоциирован с низкими показателями десятилетней выживаемости и развитием синдрома внезапной смерти. Наихудший прогноз рестриктивной кардиомиопатии в течение первых пяти лет от начала заболевания определяется в группе пациентов с дебютом клинической симптоматики в возрасте до 5 лет. В группе пациентов с рестриктивной кардиомиопатией и дебютом заболевания в возрасте старше 18 лет неблагоприятный прогноз заболевания определяется наличием постоянной формы фибрилляции предсердий.

3. Признаки нейромышечной патологии наблюдаются в 29% случаев рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированы с мутациями в генах цитоскелетных белков и клиническим дебютом кардиомиопатии в детском возрасте. Наиболее частой причиной развития рестриктивной кардиомиопатии в сочетании с нейромышечной патологией являются патогенные и вероятно-патогенные варианты в гене *FLNC*, составляя 60%.

4. Шкалы SHFM, MAGGIC, 3C-HF и MUSIC для расчета риска неблагоприятного исхода хронической сердечной недостаточности являются информативными в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией. Наибольшей чувствительностью и специфичностью в данной группе пациентов обладают шкалы, учитывающие фактор наличия постоянной формы фибрилляции предсердий и структурные параметры левого предсердия.

5. Мутации в гене десмина (*DES*) ассоциированы с нарушением структуры и функции митохондрий, снижением функции клеточного дыхания и продукции АТФ. Одним из механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена ламина А/С (*LMNA*), является нарушение способности к тканеспецифичной дифференцировке стромальных стволовых клеток и нарушение функции гистоновых деацетилаз. Молекулярные эффекты мутаций в гене тропонина I (*TNNI3*), ассоциированные с развитием рестриктивной кардиомиопатии, обусловлены усилением биохимической связи тропонина с тропомиозином и увеличением чувствительности тонких филаментов к ионам кальция.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность обеспечивается многообразием применяемых методов, соответствующих цели и задачам исследования, статистической значимостью результатов, согласованностью полученных данных и имеющихся результатов клинических и экспериментальных исследований по теме диссертации.

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на российских и международных научных конференциях и симпозиумах: Конгрессы Европейского Общества Кардиологов (2009-2018 г.), Российский национальный конгресс кардиологов (2010-2018 г.), Конференции рабочей группы Европейского Общества Кардиологов по заболеваниям миокарда и перикарда (2010-2018). Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания «Создание тест-систем для выявления заболеваний сердечно-сосудистой системы наследственной природы» 2012-2014 гг., «Разработка новых молекулярно-генетических подходов для диагностики кардиомиопатий с целью подбора персонифицированной терапии и оценки прогноза» 2015-2017 гг., «Разработка методов редактирования генома при нейромышечных заболеваниях в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы» 2015-2017 гг. По результатам исследования опубликовано 35 полнотекстовых печатных работ как в отечественных, так и в зарубежных изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации и более 20 тезисов в сборниках трудов научных конференций. Результаты исследования внедрены в практическую работу и учебный процесс ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, диагностический и лечебный процесс поликлиники ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России.

Личный вклад автора

Вклад автора состоял в анализе литературных данных, обследовании пациентов и динамическом наблюдении за ними, составлении базы данных, анализе и обобщении полученных клинических, лабораторных и молекулярно-генетических результатов, выполнении всего блока молекулярно-генетических и клеточных исследований, статистической обработке данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 314 страницах печатного текста, состоит из введения, одиннадцати глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 446 наименований, в том числе 395 – иностранных авторов, и списка иллюстративного материала. Основные результаты представлены в 43 таблицах и 54 рисунках.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией.

Исследуемая когорта пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией включала 35 пациентов взрослой и детской группы. В более чем половине случаев (22 пациента, 63%) заболевание дебютировало в возрасте до 18 лет, таким образом более половины исследуемой когорты на момент появления первых симптомов заболевания составляли пациенты детского возраста, в девяти случаях первые признаки заболевания проявились в возрасте до 3 лет, а в 14 случаях – до 5 лет. В 34% случаев отмечался семейный характер заболевания, что проявлялось сочетанием разных фенотипических форм КМП (рестриктивной, гипертрофической, дилатационной) у членов одной семьи, несущих одинаковый генетический вариант. У 10 (29%) из обследованных пациентов с идиопатической РКМП отмечались признаки нейромышечной патологии, пятерым пациентам была проведена трансплантация сердца, двое из которых имели дебют заболевания в возрасте до 18 лет.

Средний возраст дебюта заболевания в обследуемой группе составил 12 лет [1 мес – 55 лет], при этом среди пациентов детской группы с дебютом до 18 лет он составлял 3 года [1 мес – 16 лет], а среди пациентов взрослой группы 31 год [22 года – 55 лет]. Для группы пациентов с признаками НМЗ возраст дебюта заболевания был меньше по сравнению с группой пациентов без признаков НМЗ (4 года [0,5 года – 32 года] и 19 лет [1 мес – 55 лет], $p=0,0388$, Рисунок 1а). При анализе длительности заболевания и его исходов в качестве конечной точки рассматривалась смерть пациентов от сердечно-сосудистых заболеваний или трансплантация сердца. Для пациентов с дебютом заболевания до 18 лет медиана возраста достижения конечной точки составила 11 лет [1,5 года – 33 лет], а для пациентов взрослой группы (дебют после 18 лет) 50 лет [38 лет – 60 лет] ($p=0,0001$, Рисунок 1б). Продолжительность жизни после постановки диагноза для всех достигших конечной точки пациентов составила 2,4 года [1 год – 26 лет], при этом для пациентов детской группы она была меньшей и составляла 2,2 года [1 год – 18 лет], а для пациентов взрослой группы – 5,6 лет [1 год – 26 лет]. Для пациентов с дебютом заболевания в детском возрасте в группе пациентов с дебютом до 5 лет время достижения конечной точки составляло 2,0 [1,4 – 3,25] лет, а для пациентов с дебютом после 5 лет - 10 [1 – 27,25] лет ($p=0,029$; Рисунок 1в). При анализе влияния ФП на время достижения конечной точки нами было выявлено, что в группе пациентов с постоянной формой ФП оно составило 4,3 [1 – 26] лет, а в группе пациентов без постоянной формы ФП 2,9 [1 – 27,25] лет ($p=0,9$). Время достижения конечной точки во взрослой группе было существенно ниже среди пациентов с дебютом заболевания с постоянной формой ФП по сравнению с группой пациентов без постоянной

формы ФП в дебюте заболевания, соответственно, 2,1 [1 – 4] лет и 17 [7 – 27,25] ($p=0,014$; Рисунок 1г).

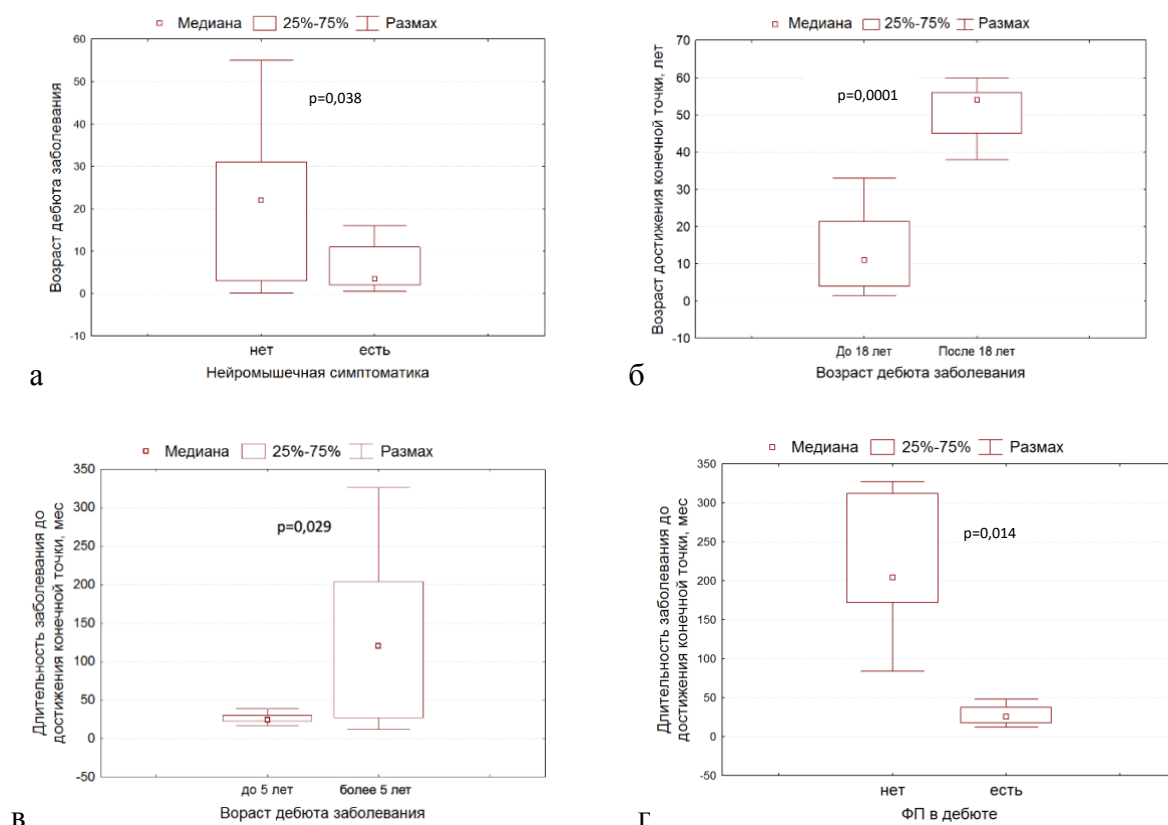


Рисунок 1 — Диаграммы Тьюки для сравнения характеристик основных групп в исследовании а) Возраст дебюта заболевания в зависимости от наличия нейромышечной симптоматики ($p = 0,0388$); б) Возраст достижения конечной точки в детской и взрослой группах ($p = 0,0001$); в) Длительность заболевания до достижения конечной точки в группах с дебютом заболевания до 5 лет и от 5 до 18 лет (всего 12 пациентов; $p=0,05$); г) То же в группах с дебютом заболевания до 5 лет и от 5 лет (всего 21 пациент; $p=0,029$); д) То же в группах с фибрилляциями предсердий и без них за все время наблюдения ($p = 0,9$) е) То же в группах с фибрилляциями предсердий в дебюте и без них ($p = 0,014$).

Пятилетняя выживаемость без трансплантации в общей группе пациентов с РКМП составила 66,5%, а десятилетняя выживаемость – 52,5% (Рисунок 2а). Важно отметить, что примерно треть пациентов (27%) достигала конечной точки в первые три года после начала заболевания. При анализе спектра нарушений ритма и их влияния на выживаемость пациентов с РКМП нами было выявлено, что 5-летняя выживаемость с начала заболевания пациентов с РКМП и постоянной формой ФП составляла 54%, а в группе без ФП – 72% ($p = 0,014$, Рисунок 2б). Наихудший прогноз наблюдается в группе пациентов, у которых дебют заболевания произошел в клинике постоянной формы ФП (Рисунок 2в).

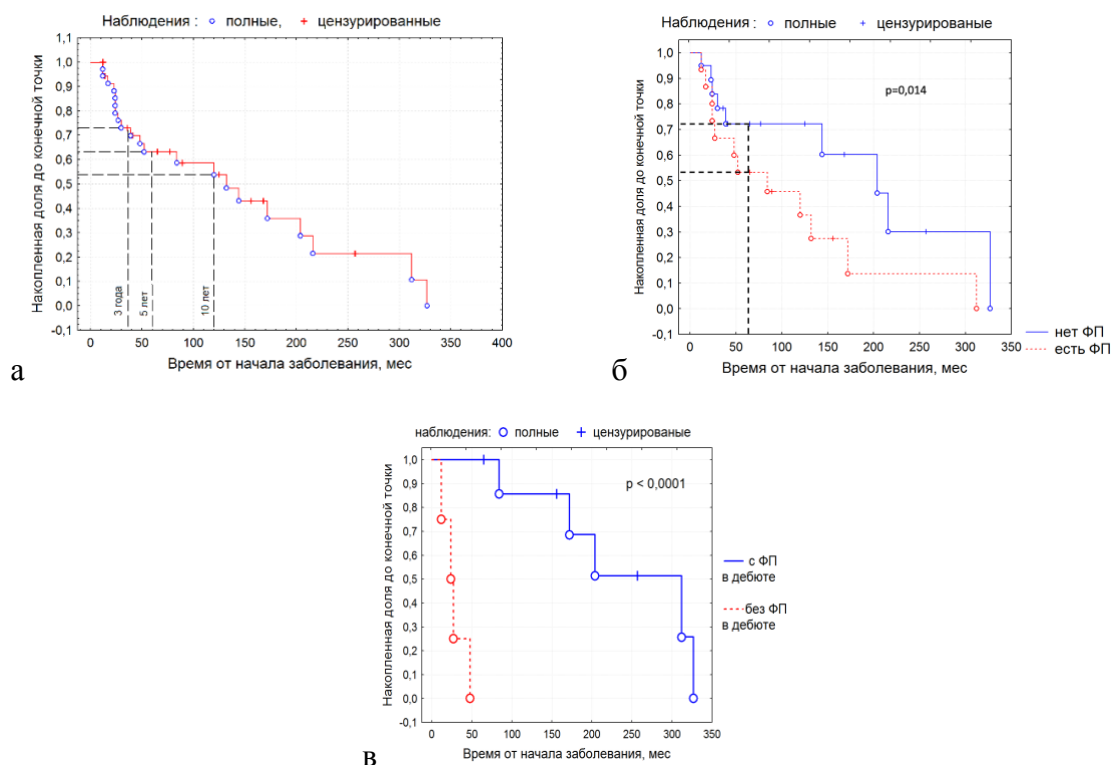


Рисунок 2 — Выживаемость пациентов с РКМП всех возрастных групп а) оценка общей кривой дожития б) сравнение кривых дожития для пациентов с ФП и без ФП; $p = 0,014$, критерий Кокса в) сравнение кривых дожития для пациентов с дебютом заболевания с постоянной формы ФП и без такового, $p < 0,0001$, критерий Кокса-Мантеля.

Сравнение кривых дожития среди пациентов различных возрастных групп не выявило разницы между пациентами с дебютом заболевания до и после 18 лет, между пациентами детской группы с дебютом до и после 5 лет, а также в общей и детской группах в зависимости от наличия или отсутствия нейромышечного фенотипа. Сравнение кривых дожития среди пациентов, достигших конечной точки, в группах с дебютом заболевания до и после пяти лет резко отличаются визуально и статистически значимо, несмотря на небольшой объем группы (Рисунок 3 а,б).

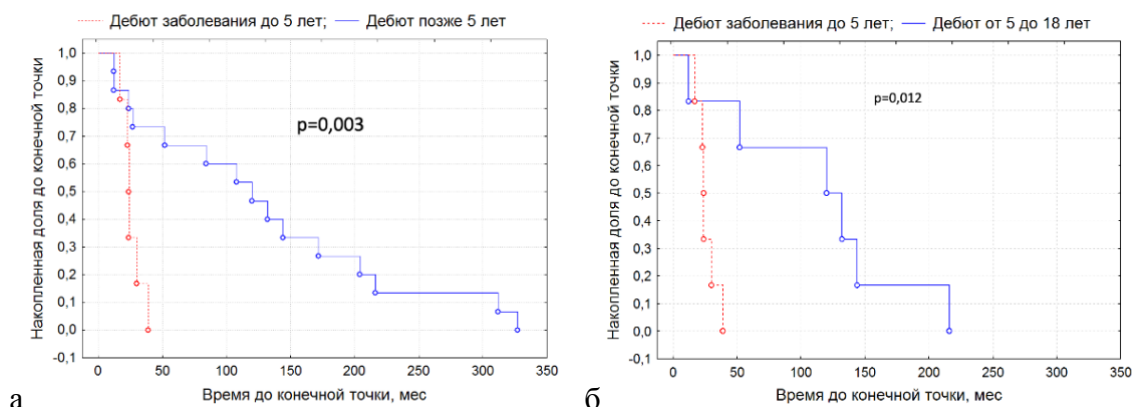


Рисунок 3 — Сравнение кривых Каплана-Мейера времени заболевания от манифестации до конечной точки для групп до и после 5 лет; а) все пациенты ($n = 21$; $p = 0,003$, тест Кокса-Мантеля); б) только среди пациентов с дебютом до 18 лет ($n = 12$; $p = 0,012$, тест Кокса-Мантеля).

В то же время, при подключении цензурированных наблюдений значимость отличий этих кривых пропадает, хотя они и отличаются по форме. Причина этого эффекта в наличии в данных порога в развитии болезни длительностью около 5 лет с начала заболевания (Рисунок 4). На Рисунке 4 заметно отсутствие полных конечных точек в левом верхнем углу так же, как и цензурированных – в правом нижнем. Это говорит о наиболее благоприятном течении заболевания у пациентов с дебютом в детской группе до 5 лет, но только тех, кто смог пережить 4-5 лет.

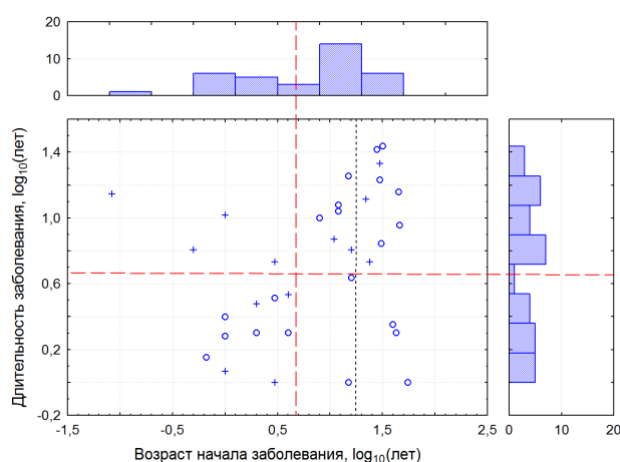


Рисунок 4 — Совместная диаграмма рассеяния возраста начала заболевания и его длительности. Оси представлены в логарифмическом масштабе. Штриховые линии – как горизонтальная, так и вертикальная – соответствуют уровню 5 лет, пунктир – 18 лет. Кружки соответствуют полным наблюдениям, а плюсики – цензурированным.

При условии, что выборка отражает истинную превалентность болезни, наиболее опасным с точки зрения быстрого достижения конечной точки является течение заболевания в группе с дебютом до 5 лет. В этой группе средний риск (инцидент) достижения конечной точки за первые пять лет среди пациентов составил на 40% больше, чем в последующие 10 лет. В этой же группе можно говорить о наиболее благоприятном течении заболевания у тех пациентов, кто смог пережить 4-5 лет.

Анализ возможности использования шкал прогноза ХСН в когорте пациентов с идиопатической РКМП

В группу идиопатической РКМП для расчета риска ХСН вошли только пациенты взрослого возраста, поскольку все известные шкалы валидизированы только для взрослых пациентов и для большинства из этих шкал не существует технической возможности оценки риска пациентов младше 18 лет. Для шкал SHFM, MAGGIC, 3С-НФ риск оценивался вероятностью достижения конечной точки (для шкал MAGGIC, 3С-НФ) или вероятностью недостижения конечной точки (для шкалы SHFM). При расчете риска с использованием шкал MAGGIC и 3С-НФ для анализа также был доступен интегральный балл, определяющий вероятность наступления

конечной точки. При использовании шкалы MUSIC риск неблагоприятного исхода ХСН отражался только в интегральных баллах без расчета вероятности достижения конечной точки и рассчитывался отдельно для оценки вероятности как общей смертности, так и смертности от совокупности сердечно-сосудистых причин, внезапной смерти и смерти по причине систолической дисфункции. В группе пациентов, достигших конечной точки (n=15, пациенты 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 19, 20, 22, 35), для расчета годового риска по вышеперечисленным шкалам использовались параметры, зарегистрированные за 8-12 месяцев до наступления конечной точки. В группе пациентов, не достигших конечной точки (n=5, пациенты 6, 10, 24, 29, 33), для расчета годового риска по вышеперечисленным шкалам использовались параметры, зарегистрированные не позднее чем за 12 месяцев до последнего наблюдения пациента. В целом, все из апробированных шкал показали высокую диагностическую точность при разделении групп пациентов, достигших и не достигших конечной точки в течение 1 года. Сравнительная характеристика шкал SHFM, MAGGIC проиллюстрирована на Рисунке 5 с помощью диаграммы рассеяния. Штриховые линии на этом рисунке отражают наиболее эффективные пороги решающих правил для опросников на исследуемой группе пациентов, рассчитанные ниже (Рисунок 5). Использование шкалы MUSIC также продемонстрировало значимое различие интегрального балла в группах пациентов, достигших и не достигших конечной точки. Данное различие было значимым как при оценке общего риска достижения конечной точки (Рисунок 6а), так и отдельно для риска достижения конечной точки по совокупности сердечно-сосудистых причин (Рисунок 6б) и по причине развития систолической дисфункции (Рисунок 6в). Важно отметить, что при оценке риска достижения конечной точки вследствие ВС использование данной шкалы не было информативно и не дало значимого различия между группами пациентов, достигших и не достигших конечной точки.

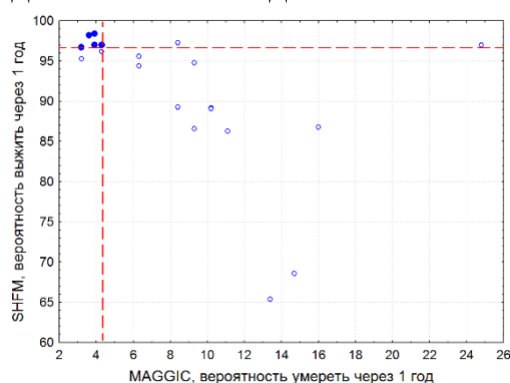


Рисунок 5 — Совместная диаграмма рассеяния одногодичного риска достижения конечной точки при использовании шкал для шкалы SHFM и MAGGIC. Оси представлены вероятностью достижения по шкале MAGGIC (ось X) и вероятностью недостижения по шкале SHFM (ось Y). Штриховые линии соответствуют уровням 4,3% (вертикальная) и 96,7% (горизонтальная).

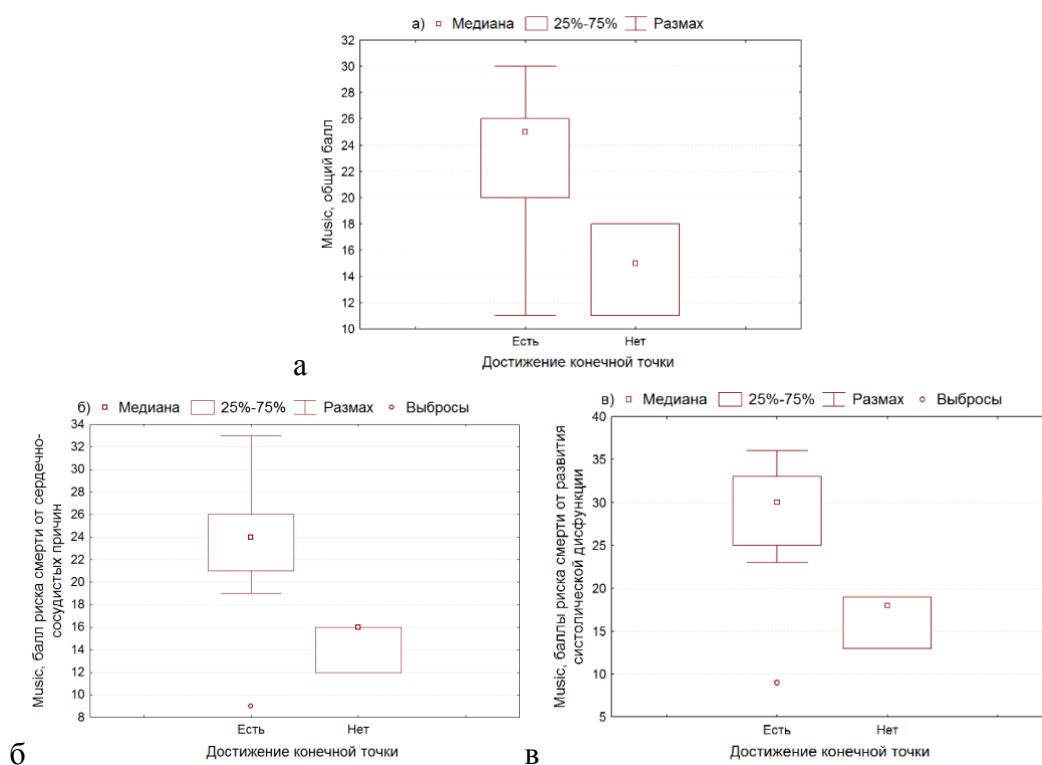


Рисунок 6 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы MUSIC в группе пациентов с РКМП; в скобках приведен уровень значимости различия по критерию Манна-Уитни; (а) интегральный балл ($p = 0,0033$); (б) балл сердечно-сосудистых причин ($p = 0,0041$); (в) балл систолической дисфункции ($p = 0,0043$).

Наибольшей прогностической точностью при оценке годового риска достижения конечной точки обладала шкала ЗС-НФ. Именно при использовании данной шкалы удалось достичь 100%-ной классификации пациентов на достигших и не достигших конечной точки (Рисунок 7).

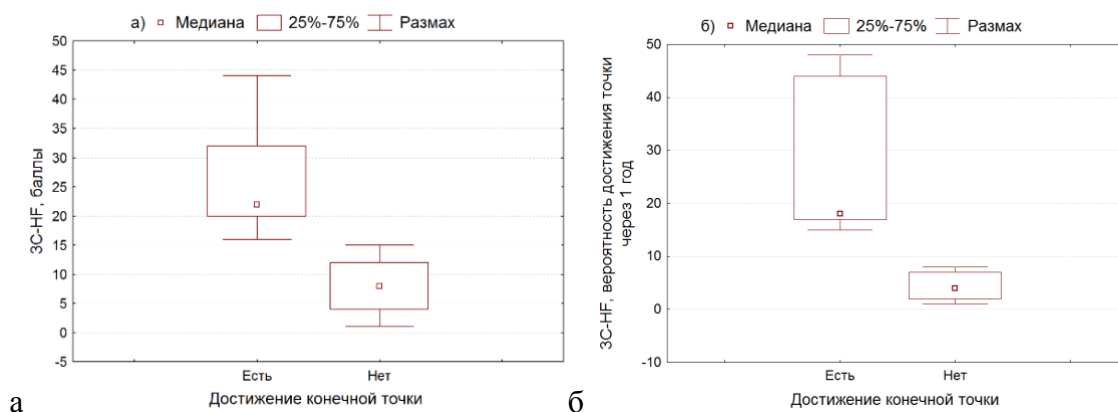


Рисунок 7 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы ЗС-НФ в группе пациентов с РКМП; (а) интегральный балл; (б) риск достижения конечной точки в течение 1 года; уровень значимости различия по критерию Манна-Уитни в обоих случаях равен $p = 0,001$.

Сравнение информативности и диагностической точности четырех апробированных опросников было проведено с помощью ROC-анализа «чувствительность-специфичность» (Рисунок 8). В целом, все опросники обладают хорошей точностью на исследуемой небольшой группе пациентов: для всех площадей под графиками (area under the curve - AUC) оценок ROC-кривых по исследуемой группе $AUC > 0,9$.

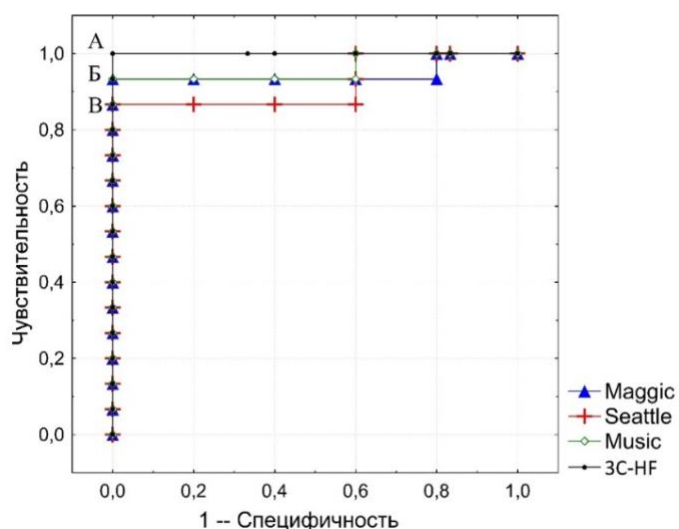


Рисунок 8 — ROC-кривые результатов опросников MAGGIC, Seattle, Music и 3C-HF оценки вероятности выжить через 1 год для исследуемой группы больных ($n=20$).

С целью выявления наиболее значимых параметров в процессе расчета вероятности неблагоприятного исхода ХСН нами был проведен дискриминантный анализ (ДА) с оценкой весового значения отдельных факторов. Процедура пошагового (с включением) ДА была применена для 18 признаков на группе из 20 пациентов. В результате в итоговую модель были включены 8 признаков (Таблица 1). Признаки упорядочены по абсолютной величине их факторных нагрузок. Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли таких факторов, как функциональный класс ХСН, ФВ и ФП в определении прогноза пациентов с РКМП.

Таблица 1 — Характеристики дискриминантной функции (ДФ) для 18 признаков

Признаки	Коэффициенты ДФ	Факторные нагрузки
Функц. Класс ХСН	-0,660	-0,287
ФВ	0,108	0,238
ФП	-3,507	-0,127
Креатинин	-0,034	-0,104
К-сберегающие диуретики	-0,053	-0,091
ИАПФ	1,024	0,071
Возраст	0,079	-0,057
Лимфоциты %	-0,296	-0,028
Константа	7,762	-

Анализ генетических причин развития заболевания в группе РКМП методом массового параллельного секвенирования.

Для определения патогенности новых и ранее описанных генетических вариантов нами были применен подход, основанный на рекомендациях американского общества по медицинской генетике ACMG. Данная классификация позволяет определять клиническую значимость обнаруженных вариантов и может быть использована при медико-генетическом консультировании.

На первом этапе секвенирование нового поколения проводилось с использованием разработанной нами целевой панели из 108 генов. Данный подход позволил выявить патогенные и вероятно-патогенные варианты у 19 из 35 пациентов (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 28, 29, 32, 33, 35). Еще у 5 пациентов идентифицированные варианты были классифицированы как варианты неопределенной значимости по классификации ACMG в связи с их выявлением впервые. Однако, с учетом функциональной значимости или локализации в саркомерных генах эти варианты были расценены нами как потенциально причинные в отношении развития заболевания (пациенты 11, 23, 30 и 34).

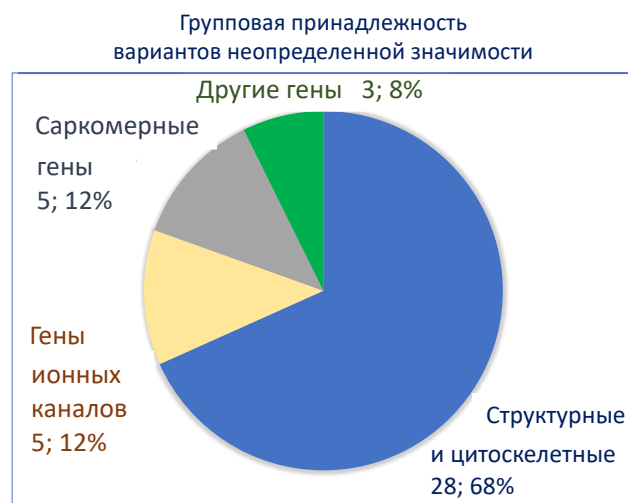
В группе из оставшихся 12 пациентов с целью идентификации генетической причины заболевания было проведено полноэкзомное секвенирование, которое позволило выявить патогенные и вероятно патогенные замены у 7 пациентов (9, 15, 16, 22, 25, 26, 31), а варианты неопределенной значимости в генах с высокой степенью экспрессии в миокарде у 4 пациентов (7, 10, 24 и 27). У одного пациента (18) экзомное секвенирование не выявило новых патогенных, вероятно-патогенных или вариантов с неопределенной значимостью в генах с высокой степенью экспрессии в миокарде. В результате доля пациентов с выявленными патогенными и вероятно-патогенными вариантами составила 74% (26 пациентов). Для последующего анализа использовалось 28 патогенных или вероятно-патогенных варианта и 41 вариант неопределенной значимости (Рисунок 9а,б). Из 28 патогенных и вероятно-патогенных вариантов 16 были обнаружены в генах, кодирующих белки саркомера (MYH7 – 5, MYBPC3 – 4, MYH6 - 1, TNNI3 – 4, TNNT2 – 1, MYL2-1) и 12 в генах, кодирующих структурные белки цитоскелета (*BAG3-1, JUP-1, ACTN2-1, DES-1, NEBL-1, FLNC-7*). Среди 41 вариантов неопределенной значимости 28 были выявлены в структурных и цитоскелетных генах (*TTN, SYNE2, MYOM1, FKTN, LDB3, EMD, MYOZ, DSP, TMPO, MYPN, ANK2, JUP, CMYA5, SGCD, SYNPO2, FLNC*), 5 в генах ионных каналов (*CACNB2, RANGRF, SCN4B, CACNA1C*), 5 в генах, кодирующих сократительные саркомерные белки (*MYH6, MYH7 и TPM1*) и в 3 генах, кодирующих другие белки (*ACDVL, TBX20 и MAP2K2*). Как и ожидалось, большинство вариантов неопределенной значимости были обнаружены в гене *TTN*. Среди 26 положительно-генотипированных пациентов у 12 (46%) причинный генетический вариант был обнаружен в генах цитоскелетных белков (пациенты 1, 4, 8, 9, 15, 16, 19, 22, 25,

26, 27, 35), а 14 (54%) в генах, кодирующих саркомерные белки (пациенты 2, 3, 5, 6, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 28, 29, 32, 33).

При этом из 14 пациентов только у 6 (23%) патогенный вариант в саркомерном гене являлся изолированным, а у оставшихся 8 пациентов (31%) патогенный или вероятно-патогенный генетический вариант в гене, кодирующем саркомерный белок, был ассоциирован с вариантом неопределенной значимости в цитоскелетных генах (6, 12, 13, 14, 21, 29, 32, 33). Перечень всех выявленных в группе пациентов с идиопатической РКМП патогенных, вероятно-патогенных вариантов и вариантов неопределенной значимости представлен в Таблице 2.



а



б

Рисунок 9 — Спектр патогенных, условно патогенных вариантов и вариантов неопределенной значимости в группе пациентов с РКМП.

Таблица 2 — Список патогенных, вероятно-патогенных вариантов и вариантов неопределенной значимости у пациентов с РКМП, выявленных методом целевого и экзомного секвенирования нового поколения

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
1	П	BAG3	chr10:121431885:C>T NM_004281: P209L	rs121918312		Д	TTN		chr2:179428256:T>C NM_001267550: T27535A	0.07	Н
							MYOM1	rs376646252	chr18:3085111:C>T NM_003803: G1424E	0.002	Д
2	ВП	TNNT2	chr1:201332505:CTC>- NM_001001432: 158_158del*			-					
3	П	MYH7	chr14:23894612:C>T NM_000257: G768R	rs727503260		Д					
4	ВП	JUP	chr17:39925402:G>A NM_021991: R176W	rs368336007	0.007	Д	CACNB2		chr10:18787342:A>G NM_201597: D131G		Д
5	П	TNNI3	chr19: 55663260:G>A NM_000363: R192H	rs104894729		Д					
6	П	MYBPC3	chr11:47354816:TCCAC>- NM_000256: E1085fs			-	FKTN		chr9:108377558:G>A NM_006731: 781-1G>A		-
7							TTN	rs375533809	chr2:179629287:C>T NM_133379: V3319I	0.003	Н
							TBX20		Chr7: 35244135:949delT NM_001077653.2: Y317fs		
8	ВП	ACTN2	chr1:236889307:A>T NM_001278343: N175Y			Д					
9	ВП	FLNC	chr7: 128494631:C>T NM_001458: P2298S			Д	RANGRF	rs201464864	chr17:8192147:T>C NM_016492: F14S	0.007	Д
							ACADVL		chr17:7121058:A>G NM_001270447: I18V		Н
10							SYNPO2L		chr10: 5407587:C>T NM_001114133: S608N		Н
11							TPM1		chr15: 63349230:A>T NM_001018005: E60V		
12	ВП	MYH7	chr14:23893311:G>C NM_000257: I909M	rs377722048		Д	LDB3	rs530979771	chr10:88441527:G>A NM_001171610: R219Q	0.004	Н
							EMD		chrX:153608649:G>T NM_000117: E107D		Н
13	П	MYBPC3	chr11:47353740:G>A	rs397516037	0.0008	-	TTN		chr2:179445166:C>A	0.002	Н

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
26	П	FLNC	chr7: 1128494628:G>A NM_001458: V2297V			Д					
27							CMYA5		chr5: 79026636:A>G NM_153610: E683G		Н
28	Р	TNNI3	chr19:55665439:G>A NM_000363: R170G			Д					
29	ВП	MYBPC	chr11:47364206:1543-1547del NM_000256: N515fs			Д	TTN		chr12: 179582828:C>A NM_133379: T8302K		Н
	ВП	MYH6	chr14: 23862177:G>C NM_002471: Q1065H	rs267606904	0.03	Д	MYH6	rs201827489	chr14: 23856794:C>T NM_002471: R1532C	0.004	Д
30							TTN		chr12: 179415873:G>A NM_133379: R30462Q		Д
							MYPN	rs201454261	chr10: 69881997:C>T NM_001256267: P268S	0.03	Н
							MYH6		chr14: 23858646:C>G NM_002471: Q1312E		Д
31	ВП	FLNC	chr7: 128489034:4926_4927del NM_001458: T1642fs								
32	ВП	MYH7	chr14 23901007:T>C NM_000257: I201T	rs397516258		Н	MYPN	rs201454261	chr10: 69881997:C>T NM_001256267: P268S	0.03	Н
							MAP2K2	rs749615795	chr19: 4090636:G>A NM_030662: R388Q	0.00009	Н
33	ВП	MYL2	chr12: 111358331:G>A NM_000432: M11*			Н	ANK2		chr4: 114275041:C>T NM_001148: P1756L		Д
							SGCD		chr5: 155771533:C>G NM_172244: T13S		Н
34							TPM1		chr15: 63340841:G>T NM_001330351: A23S		Н
							JUP		chr17: 39925375:C>G NM_021991: L185V		Н
							CACNA1C	rs370432385	chr12: 2786373:G>A NM_199460: A1696T	0.008	Д
35	ВП	NEBL	chr10: 21129751:G>T NM_006393.2: E419X*	rs201103536	0.009						

* - варианты, обнаруженные в гомозиготном состоянии. Н(Tolerated) -нейтральный предсказанный структурный эффект замены, Д (Damaging) – патогенный предсказанный структурный эффект замены. Предсказание структурного эффекта проводилось с помощью программного пакета MetaSV

Анализ влияния патогенных и вероятно-патогенных мутаций в группе РКМП на клиническое течение заболевания.

При анализе влияния выявленных генетических вариантов на течение и прогноз РКМП в различных возрастных группах учитывались только патогенные и вероятно-патогенные варианты в группах саркомерных и цитоскелетных генов. Из-за небольшого количества наблюдений группы генов ионных каналов и других генов в анализ включены не были. Общая безтрансплантационная выживаемость в период всего срока наблюдения не отличалась между пациентами с патогенными и вероятно-патогенными вариантами в группах саркомерных и цитоскелетных генов. Не было выявлено различия при сравнении кривых дожития между носителями патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных и цитоскелетных генах как в общей группе, так и в группе пациентов с дебютом до и после 18 лет. При более детальном анализе данного наблюдения было показано, что в группе пациентов с дебютом заболевания до 18 лет пятилетняя безтрансплантационная выживаемость среди пациентов с патогенными и вероятно-патогенными вариантами в группе саркомерных генов составляла 33,3%, а в группе цитоскелетных генов – 70% (Рисунок 10а) в то время как в группе пациентов с дебютом во взрослом возрасте данного отличия не наблюдалось.

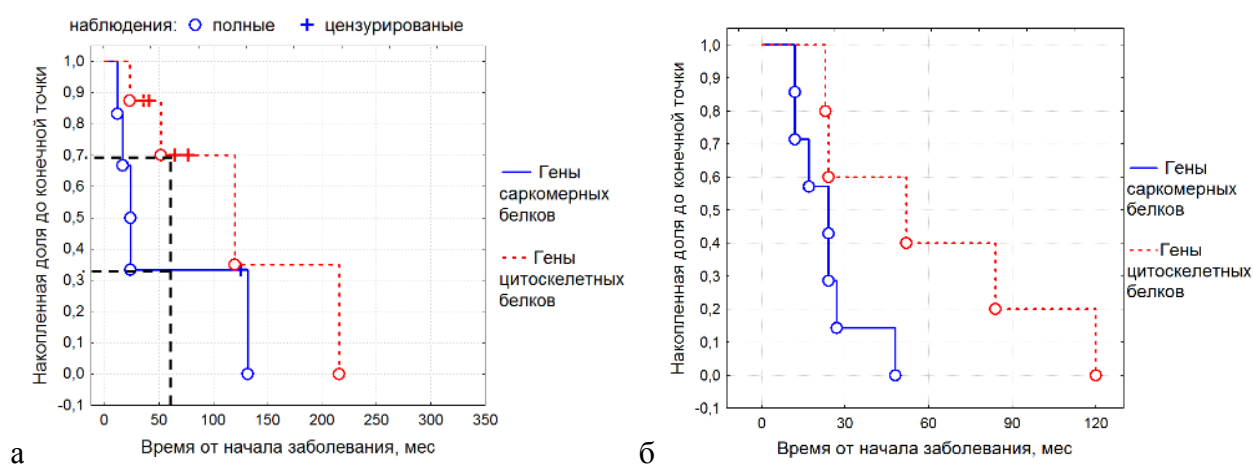


Рисунок 10 — Выживаемость пациентов с РКМП в зависимости от деления по следующим категориям: а) Наличие патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов при дебюте заболевания до 18 лет б) Сравнение кривых десятилетнего дожития пациентов двух групп с наличием патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов с полным наблюдением ($p < 0,047$, тест Кокса-Мантеля).

Сравнение кривых десятилетнего дожития пациентов с полным наблюдением в двух группах с наличием патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных и цитоскелетных генах выявило значимое различие с неблагоприятным течением заболевания у носителей саркомерных вариантов ($p = 0,047$, Рисунок 10б).

Таким образом, причинный генотип пациента вносит наибольший вклад в течение РКМП в группе пациентов с дебютом заболевания в детском возрасте в первые пять лет после появления клинической картины заболевания. В данной группе наихудший прогноз наблюдается среди пациентов с причинными вариантами в саркомерных генах и связан, в основном, с развитием синдрома ВС. Наличие патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных генах у всех пациентов с РКМП ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания в течение первых десяти лет. В группе пациентов с дебютом заболевания до 18 лет и причинными вариантами в цитоскелетных генах у всех пациентов отмечались признаками НМЗ, а основной причиной достижения конечной точки являлось смерть от явлений ХСН и трансплантация сердца. Прямое включение его в состав ранее построенной ДФ дало небольшое изменение факторных нагрузок, но не повлияло на порядок распределения ведущих факторов. Таким образом, генотип пациента не вносит существенного вклада в определение риска неблагоприятного исхода ХСН у пациентов с идиопатической РКМП в течение 1 года.

Исследование генетической этиологии РКМП в сочетании с признаками поражения нервно-мышечной системы.

Среди 35 пациентов с РКМП у 10 при клиническом обследовании или сборе анамнеза обнаруживались признаки нервно-мышечной патологии, которые проявлялись мышечной слабостью, повышением уровня общей фракции КФК, мышечной гипотонией, слабостью мышц верхнего или нижнего плечевого пояса. В группе пациентов с дебютом в детском возрасте в качестве проявлений нейромышечной патологии также рассматривались мышечные дисторсии, артрогриппоз и камптодактилия. У 5 из 10 пациентов признаки миопатии были подтверждены нейромиографией. Поскольку наличие нервно-мышечной симптоматики во многом может определять прогноз и врачебную тактику в отношении пациентов с кардиомиопатиями, при обработке клинических и генетических данных эта группа пациентов была проанализирована более углубленно. Генетическое обследование с использованием целевой панели кардиальных генов позволило выявить генетическую природу заболевания у 2 из 10 пациентов. В этих случаях причинными генами являлись гены *DES* и ген *BAG3*. Для обоих генов ранее были описаны случаи развития кардиомиопатии, в частности РКМП, в сочетании с нейромышечной патологией. У восьми пациентов с признаками нейромышечной патологии в качестве следующего этапа было проведено полноэкзомное секвенирование. В результате у 6 пациентов были выявлены варианты в гене филамина С (*FLNC*), которые были классифицированы как патогенные или вероятно-патогенные, у одного пациента был выявлен новый ранее не описанный вариант в гене *SMYD5*, классифицированный как вариант неопределенной значимости, у одного пациента не было обнаружено новых патогенных, вероятно-патогенных вариантов или вариантов неопределенной значимости. Детальный клинический анализ выявил, что случаи, ассоциированные с мутациями в гене *FLNC*, имеют ряд сходных клинических

проявлений заболевания: дебют РКМП в раннем детском возрасте, умеренные признаки миопатии без значимого прогрессирования, артрогрипоз, миопатия с поражением мышц пояса нижних конечностей, незначительно повышенные значения КФК_{общ} и врожденный вывих тазобедренного сустава при рождении. У двух пациентов проявления со стороны мышечной системы носили нетипичный характер и проявлялись сегментарными мышечными контрактурами – камптодактилией и мышечной кривошеей, также умеренным увеличением сывороточного уровня ЛДГ. Важно отметить, что в трех из 6 случаев описанных филминопатий была обнаружена A1186V мутация, в четвертом - A1183L. Филогенетический анализ подтвердил консервативность данных аминокислотных замен среди различных видов организмов.

Для определения механизма патологического воздействия выявленных нами мутаций и уточнения их роли в формировании внутриклеточных белковых агрегатов нами было проведено моделирование эффекта описанных мутаций путем трансфекции клеток линии C2C12 с использованием липофектамина генетическими конструкциями *FLNC-GFP*, несущими замены A1183P, A1186V, а также замену P2298S, не ассоциированную в исследуемой группе с нейромышечной симптоматикой. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью анти-GFP-антител выявило сохранность филаментозной структуры филаминина С и отсутствие внутриклеточных агрегатов. Распределение в структуре гена *FLNC* выявленных нами, а также ранее описанных патогенных вариантов, впервые описанном новом фенотипе филаминопатии, включающем сочетание РКМП с врожденной миопатией и артрогрипозом с дебютом в раннем связанных с различными типами кардиомиопатий, не позволило идентифицировать какие-либо участки гена, мутации в которых преимущественно связаны с определенным фенотипом. Однако определение позиции аминокислотных замен в структуре иммуноглобулиновых доменов выявило преимущественную локализацию всех ГКМП и РКМП-ассоциированных вариантов в петлях иммуноглобулинов. Таким образом, нами сделан вывод о том, что именно локализация аминокислотной замены в структуре иммуноглобулина, а также тип мутации (миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания или мутация, приводящая к нарушению сплайсинга гена), а не расположение мутации в структуре гена является определяющей в отношении формы кардиомиопатии и типа ремоделирования миокарда.

Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена десмина (DES).

1. Оценка влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального Ca^{2+} в мышечных клетках.

Для оценки влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального кальция использовалась первичная культура

мышечных клеток (сателлитные клетки), генетически модифицированных лентивирусными конструкциями, несущими ген десмина дикого типа или мутантные формы десмина. Изменение уровня внутримитохондриального кальция определяли из соотношения постстимулированного уровня к базовому (F/F₀). При сравнении эффекта десмина дикого типа с мутантными формами DesL345P, DesA357P, DesL370P и DesD399Y наблюдалось достоверное снижение содержания внутримитохондриального кальция [Ca²⁺]_{mit} под воздействием мутаций L345P и A357P, определяемое по соотношению показателей F/F₀, на 50% и 44% соответственно (Рис. 11а). В то же время мутации L370P и D399Y не вызывали достоверного изменения уровня внутримитохондриального кальция [Ca²⁺]_{mit} (3,45±0,53 и 2,85±0,31). Альтернативным электрической стимуляции методом повышения цитоплазматического уровня кальция и его митохондриального захвата в миотрубках является применение CmC, который является агонистом рианодинового рецептора. При химической стимуляции рианодинового рецептора под воздействием 4-хлор-М-крезола (CmC) наблюдалось значительно меньшее возрастание внутримитохондриального уровня кальция в клетках, несущих мутантный вариант DesL370P и особенно DesA357P гена десмина по сравнению с клетками, несущими ген десмина дикого типа (Рис. 11б). Таким образом нами было показано, что после стимуляции током с частотой 10Hz или CmC уровень внутримитохондриального захвата кальция в мутантных клетках ниже по сравнению с таковым в клетках, несущих десмин дикого типа.

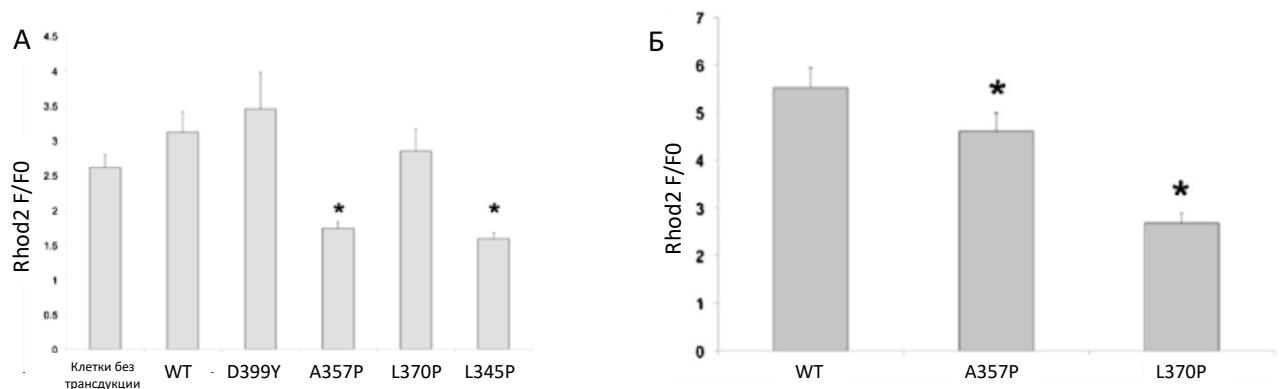


Рисунок 11 — Влияние мутаций в гене десмина на внутримитохондриальный захват кальция под действием электрического тока (а) и 4-хлор-М-крезола (б). *-p<0.05.

2. Оценка функции клеточного дыхания в культуре миотрубок после трансдукции нормальным и мутантными формами гена десмина.

Для измерения уровня продукции кислорода мышечными клетками под влиянием различных мутаций гена десмина сателлитные клетки трансдуцировали лентивирусными конструкциями, несущими нормальный и мутантные формы десмина. Измерение уровня кислорода с помощью прибора «Seahorse» показало, трансдукция мутантными формами десмина DesL345P, DesA357P и DesD399Y приводила к значимому снижению уровня

максимального стимулированного дыхания под воздействием FCCP (Рисунок 12). Таким образом, под воздействием мутантных форм десмина DesL345P, DesA357P и DesD399Y в дифференцированных клетках мышечной линии наблюдалось достоверное снижение уровня стимулированного митохондриального дыхания.

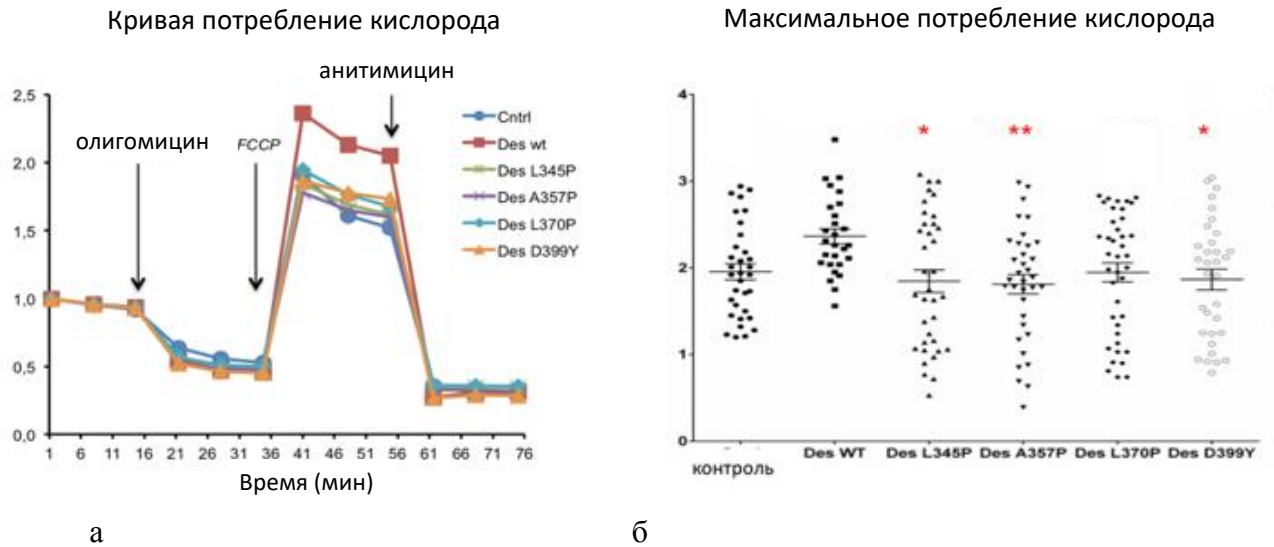


Рисунок 12 — Функция клеточного дыхания в культуре миотрубок под влиянием различных мутаций гена десмина. А. Кривая потребления кислорода на поверхности клеток. Б. Уровень стимулированного FCCP дыхания. $p < 0,05$ (*) и $p < 0,001$ (**).

Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена ламина (LMNA).

1. Влияние мутации гена ламина на колониобразующую способность ММСК, адипогенную и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток.

Способность к колониобразованию является одной из ключевых характеристик ММСК, поэтому в работе оценивалось влияние различных мутаций гена *LMNA* на способность ММСК к клональной экспансии. Трансдукция указанными генетическими конструкциями с мутациями гена *LMNA* не приводила к существенному изменению экспрессии, усилению либо ингибированию ламина, а также нарушению его структуры и функции. Во всех клеточных линиях, трансдуцированных мутантными формами ламина А/С, отмечалось достоверное снижение способности к образованию колоний по сравнению с клетками, трансдуцированными ламином дикого типа. Наиболее выраженное ингибирующее действие наблюдалось при трансдукции клеток мутантными формами *LMNAR471L* и *LMNAR482L*. Таким образом, мутации гена *LMNA* значимо уменьшают клоногенные свойства ММСК. Влияние различных

мутаций *LMNA* на адипогенную дифференцировку ММСК оценивалось посредством окрашивания клеток в терминальной стадии дифференцировки масляным красным (Рисунок 13а, б). Мутации, связанные с развитием ЧСЛД (*LMNAG465D* и *LMNAR482L*) и МАД (*LMNAR527C*), приводили к достоверному увеличению способности трансдуцированных ими ММСК к адипогенной дифференцировке по сравнению с ламинем дикого типа (*LMNAWT*). Для оценки влияния мутаций *LMNA* на остеогенную дифференцировку клетки в терминальной стадии дифференцировки окрашивали ализариновым красным. Мутация, ассоциированная с развитием МАД (*LMNAR471C*), приводила к статистически значимому увеличению способности трансдуцированных ММСК к остеогенной дифференцировке по сравнению с ламинем дикого типа (Рисунок 13в, г).

2. Влияние мутации *LMNA* на экспрессионный профиль при дифференцировке ММСК.

Увеличенная способность ММСК к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях под воздействием мутаций гена *LMNA* не всегда коррелирует с однонаправленным изменением экспрессии основных маркеров дифференцировки. В связи с этим мы проанализировали влияние мутаций *LMNA* на экспрессию 84 генов, участвующих в тканеспецифичной дифференцировке, на разных временных точках посредством ПЦР в реальном времени. Нами было показано, что в ходе адипогенной дифференцировки ММСК уровень экспрессии 29 из 84 генов значимо изменялся под воздействием мутантных форм ламина по сравнению с ламинем дикого типа. Уровень экспрессии 11 из этих генов изменялся под воздействием мутации R482L, 5 – под воздействием мутации G465D, 7 – под воздействием мутации G232E, 6 и 9 – под воздействием мутаций R471C и R527C соответственно. Применение метода иерархической кластеризации показало, что мутации, приводящие к одинаковым клиническим фенотипам, часто вызывают сходное изменение профиля экспрессии. В частности, мутации, связанные с ЧСЛД, имеют противоположный эффект в отношении экспрессии тканеспецифичных генов по сравнению с МАД-ассоциированными мутациями. Для мутации G232E, ассоциированной с поражением мышечной ткани, выявлен промежуточный профиль изменения экспрессии по сравнению с мутациями ЧСЛД и МАД. Для дальнейшего изучения влияния мутаций *LMNA* на процесс тканеспецифичной дифференцировки ММСК мы применили аналогичный подход и провели анализ экспрессии 84 генов, участвующих в остеогенезе. По аналогии с эффектом, наблюдаемым при адипогенной дифференцировке, для каждой мутации *LMNA* был отмечен уникальный профиль дифференциально экспрессирующихся генов. Кластерный анализ показал, что мутации *LMNA* с аналогичным изменением профиля экспрессии приводит к одному и тому же клиническому фенотипу ламинопатий. Эффект различных мутаций *LMNA* на экспрессию генов в ходе остеогенной дифференцировки имеет специфичный для каждой мутации характер и ассоциирован с клиническим проявлением мутаций.

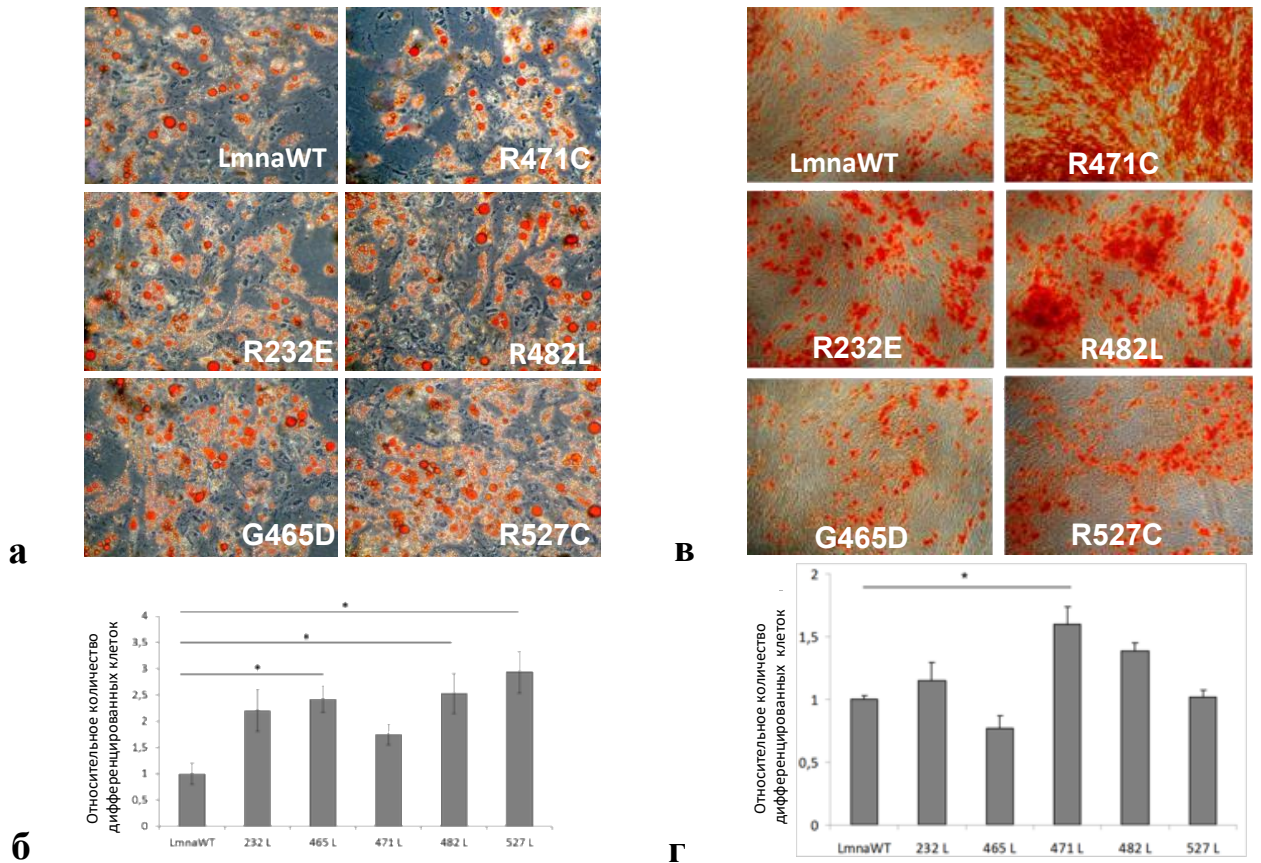


Рисунок 13 — Влияние различных мутаций гена ламина на клоногенные свойства ММСК и дифференцировку ММСК в адипогенном и остеогенном направлениях. а, б - влияние на адипогенную дифференцировку. в, г- влияние на остеогенную дифференцировку. $p < 0,05$ (*).

Таким образом, изменения в экспрессии генов под воздействием различных мутаций *LMNA* имеют специфичный для каждой мутации характер и ассоциированы с фенотипическими проявлениями заболевания.

3. Оценка влияния мутаций гена *LMNA* на дифференцировку сателлитных мышечных клеток в миогенном направлении.

Влияние ассоциированных с кардиомиопатией и миопатией мутаций гена ламина *LMNA* G232E и *LMNA* R571S на процесс миогенеза оценивали на модели первичных сателлитных клеток мышцы, выделенных из *m. soleus*. Сателлитные клетки трансдуцировали вирусом, несущим ген ламина дикого типа *LMNA* WT или мутантные формы *LMNA* G232E и *LMNA* R571S. В процессе дифференцировки оценивались эффективность слияние клеток, формирование миотрубок, а также их морфология. Анализа массива микрофотографий показал, что клетки, экспрессирующие мутантные формы ламина, образуют более

короткие миотрубки, а также миотрубки, в которых нарушен процесс расхождения ядер к полюсам. Миотрубки, экспрессирующие эндогенный ламин или экзогенный ламин дикого типа, в большинстве случаев имеют вытянутую форму и в 65-70% случаев включают более 15 ядер (Рисунок 14). В то же время, 60% миотрубок, экспрессирующих мутантный ламин *LMNA* R571S, ассоциированный с развитием кардиомиопатии, включали 5-10 ядер. Миотрубки, экспрессирующие мутантную форму ламина *LMNA* G232E, ассоциированную с миопатией, были самыми короткими и включали 1-2 ядра. Нами было показано, что в нетрансдуцированных клетках и клетках, трансдуцированных *LMNA* WT, индексы слияния не отличались, составляя $47,99 \pm 0,45\%$ и $46,97 \pm 1,49\%$ соответственно. При этом индексы слияния клеток, экспрессирующих мутантные формы *LMNA*, были значительно ниже – $17,98 \pm 1,83$ и $12,42 \pm 4,24$ для R571S и G232E соответственно.

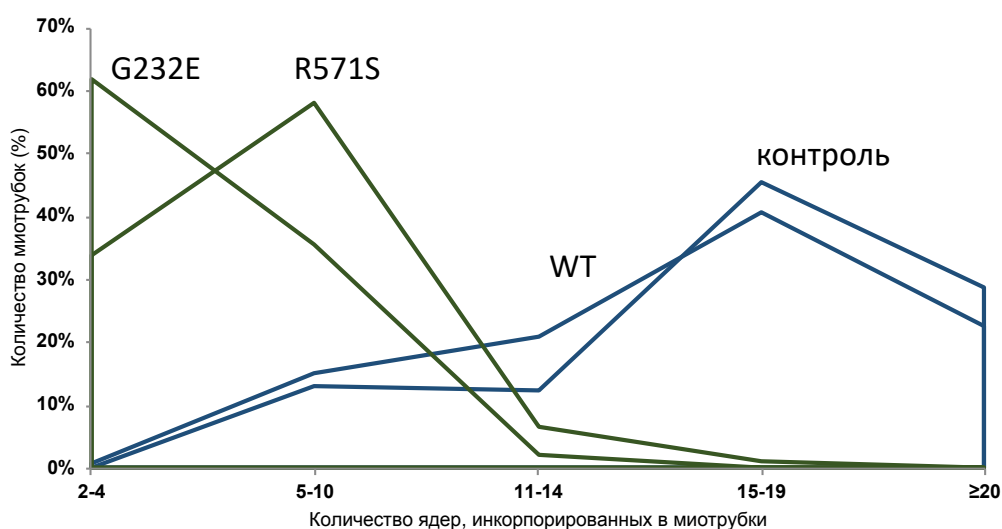


Рисунок 14 — Влияние мутаций в гене ламина на миогенные свойства клеток. Распределение миотрубок по количеству содержащихся в них ядер. Миотрубки с мутантной формой ламина R517S (n=74 миотрубки) содержат 5-10 ядер, а с мутацией G232E (n=62 миотрубки) - 2-4 ядра по сравнению с клетками дикого типа (WT) и контрольными нетрансдуцированными (n=120 миотрубок).

4. Влияние мутаций *LMNA* на экспрессию маркеров миогенной дифференцировки и активность гистондеацетилазы.

Оценку влияния мутаций гена ламина на экспрессию ряда основных факторов миогенной дифференцировки (*Six1*, *Pax3*, *Pax7*, *Myf5*, *Myomaker*, *MyoD*, *MyoG*, *Myh4*, *Mrf4*) проводили в культуре мышечных миобластов линии C2C12 через 24 часа и через семь суток после начала дифференцировки. В клетках, несущих мутацию *LMNA* G232E, значимо менялся уровень экспрессии генов *Myf5* и *MyoD* по сравнению с клетками, трансдуцированными *LMNA* WT. На поздних сроках дифференцировки наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии поздних маркеров миодифференцировки – генов *MyoG* и *Mrf4* в 1,6 ($p < 0,05$) и в 1,5 раз ($p < 0,01$) соответственно, по сравнению с клетками,

трансдуцированными *LMNA* WT. На фоне мутации *LMNA* G232E экспрессия гена *Myotaker* была достоверно снижена в 2,4 раза ($p < 0,01$) через 24 часа и в 2,1 раза ($p < 0,05$) через семь дней дифференцировки относительно уровня его экспрессии в клетках *LMNA* WT.

Одним из предполагаемых механизмов, с помощью которых ядерная ламина влияет на транскрипцию и экспрессию генов в процессе дифференцировки, является участие ее компонентов в организации хроматина посредством взаимодействия с факторами эпигенетического контроля, в частности, гистоновыми деацетилазами (HDAC). В связи с этим нами была исследована базальная активность гистоновых деацетилаз в недифференцированных ММСК, модифицированных различными мутантными формами *LMNA*. Общая активность гистоновых деацетилаз увеличивалась в клетках, несущих все мутации *LMNA* по сравнению с клетками, трансдуцированными геном ламина дикого типа (Рисунок 15). Таким образом, введение различных мутантных форм *LMNA* вызывает увеличение общей активности гистоновых деацетилаз в недифференцированных ММСК.

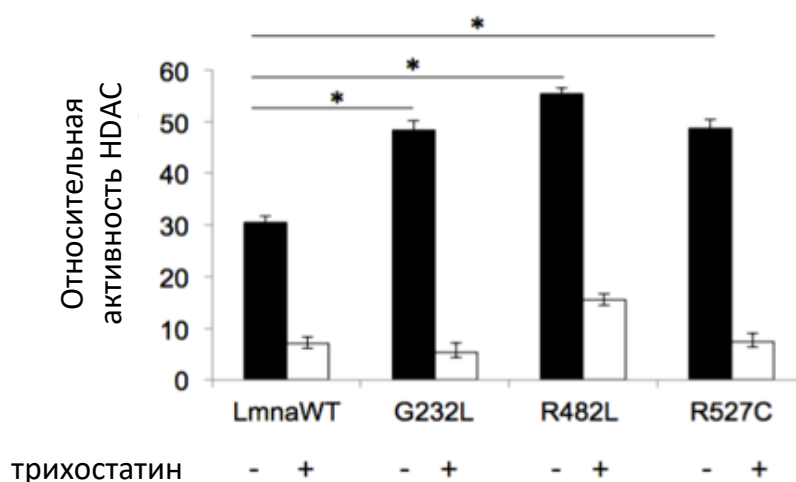


Рисунок 15 — Оценка активности гистоновых деацетилаз под влиянием мутаций в гене *LMNA*. Данные представлены в виде средних значений \pm SEM. * $p < 0,05$.

Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена тропонина I (TNNT3).

Ген тропонина I (*TNNT3*) до настоящего времени считался основным геном, ассоциированным с РКМП, и мутации в нем составляли до 30% причин развития РКМП. В данном исследовании нами верифицировано 4 патогенных варианта в гене *TNNT3*, все из которых приводили к дебюту заболевания в детском возрасте (пациенты 5, 20, 21, 28). Учитывая значимую частоту мутаций гена *TNNT3* среди пациентов с РКМП и ассоциированный с ними неблагоприятный прогноз, нами был проведен углубленный биофизический анализ молекулярных свойств мутантных форм тропонина I, выявленных в данном исследовании. В частности,

были проанализированы 2 патогенных варианта в аминокислотной позиции 170 белка TNN13- R170G и R170W, приводящие к раннему дебюту РКМП в возрасте до 3 лет, развитию ФП и неблагоприятному прогнозу.

Способность мутантных форм тропонина I (сTnI-R170G и сTnI-R170W) интегрироваться в сердечный тропониновый комплекс исследовалась методом коседиментации. Для формы тропонина сTnI-R170G не наблюдалось значимого изменения включения в актин-тропониновый комплекс по сравнению с тропонином дикого типа. В то же время для сTnI-R170W наблюдалось снижение интеграции в тонкие филаменты, что выражалось снижением на 26% включения мутантной формы в актин-тропониновый комплекс. Кинетика связывания мутантных форм с актином и тропомиозином также различалась между собой. Связывание с тропомиозином было значительно увеличено в случае обеих мутаций (Таблица 3, 4), что выражалось в снижении константы диссоциации,

Таблица 3 — Кинетика связывания сTnI-R170G/W с тропомиозином

	WT		R170G		R170W	
$k_a[M^{-1}s^{-1}]$	$1,58 \times 10^4$	$\pm 4 \times 10^{-1}$	$2,86 \times 10^4$	$\pm 2,1 \times 10^{-1}$	$7,10 \times 10^3$	$\pm 8 \times 10^{-1}$
$k_d[s^{-1}]$	32,40	$\pm 3 \times 10^{-4}$	3,10	$\pm 6,0 \times 10^{-3}$	1,63	$\pm 4 \times 10^{-4}$
$K_D[\mu M]$	2,05	$\pm 6 \times 10^{-5}$	0,12	$\pm 2,0 \times 10^{-4}$	0,23	$\pm 6 \times 10^{-8}$
N	3		3		3	

$k_a[M^{-1}s^{-1}]$ — скорость ассоциации, $k_d[s^{-1}]$ — скорость диссоциации, $K_D[\mu M]$ — константа диссоциации, N — количество экспериментов.

Таблица 4 — Кинетика связывания сTnI-R170G/W с глобулярным актином

	WT		R170G		R170W	
$k_a[M^{-1}s^{-1}]$	3880	$\pm 3 \times 10^{-1}$	5430	$\pm 2 \times 10^{-3}$	2610	$\pm 6 \times 10^{-2}$
$k_d[s^{-1}]$	$2,07 \times 10^{-2}$	$\pm 1 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-2}$	$\pm 7 \times 10^{-9}$	$1,65 \times 10^{-2}$	$\pm 4 \times 10^{-7}$
$K_D[\mu M]$	5,34	$\pm 5 \times 10^{-4}$	3,2	$\pm 2 \times 10^{-6}$	6,32	$\pm 2 \times 10^{-4}$
N	3		3		3	

$k_a[M^{-1}s^{-1}]$ — скорость ассоциации, $k_d[s^{-1}]$ — скорость диссоциации, $K_D[\mu M]$ — константа диссоциации, N — количество экспериментов.

в то время как связывание с глобулярным актином было повышено для сTnI-R170G и незначительно, но достоверно снижено для сTnI-R170W.

Таким образом, для обеих мутантных форм тропонина наблюдалось нарушение связывания с актином и тропомиозином и включения в комплекс тонких филаментов, а также. Изменение константы диссоциации при взаимодействии мутантных форм тропонина с тропомиозином и актином свидетельствует об усилении связывания сTnI-R170G с белками тонких филаментов и незначительном ослаблении взаимодействия с актином для сTnI-R170W.

Оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы.

Наблюдаемые нарушения взаимодействия мутантных форм тропонина I сTnI-R170G и сTnI-R170W с актином и тропомиозином могут влиять не только на соотношение белковых молекул внутри актин-тропонин-тропомиозинового комплекса, но также на взаимодействие с миозиновыми филаментами, актин-миозиновой АТФазой и чувствительность к ионам кальция. В связи с этим нами была исследована зависимость активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от концентрации Ca^{2+} в модели восстановленных тонких филаментов. Введение любой из исследуемых мутантных форм тропонина, сTnI-R170G или сTnI-R170W, в комплекс фибриллярного актина и тропомиозина, сходным образом приводило к сдвигу кривой зависимости активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от Ca^{2+} вправо, демонстрируя снижение чувствительности к ионам кальция (Рисунок 16а). Однако, при исследовании силы сокращения миоцитов, изолированных из миокарда морской свинки после обменного замещения тропонина I на нормальную или мутантные формы сердечного тропонина I человека, напротив, наблюдалось выраженное увеличение силы сокращения при более низких концентрациях ионов кальция (Рисунок 16б). Данное расхождение может быть обусловлено взаимодействием молекул тропонина и тонких филаментов с другими белками миофиламентов, в частности, с миозинсвязывающим белком С (MyBP-C), который участвует в процессе генерации силы сокращения при исследовании изолированных миоцитов. В связи с этим при повторном исследовании активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в состав восстановленных филаментов был добавлен N-концевой фрагмент миозинсвязывающего белка С (MyBP-C C0C2). При добавлении MyBP-C C0C2 к восстановленному актин-тропонин-тропомиозиновому комплексу наблюдалось возрастание чувствительности к ионам Ca^{2+} , регистрируемое как увеличение pCa_{50} , а также сдвиг кривой зависимости влево (Рисунок 16с).

Таким образом, проведённые эксперименты с использованием методов коседиментации и биофизических методов исследования показали нарушение взаимодействия мутантных форм тропонина сTnI-R170G и сTnI-R170W с актином и тропомиозином, а также связь эффекта мутантного белка по отношению к сократимости миофиламентов и к активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы с присутствием в системе миозинсвязывающего белка С.

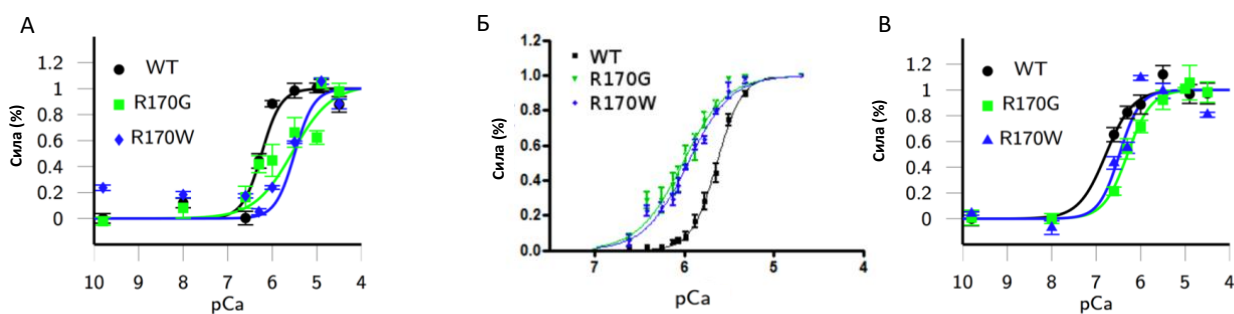


Рисунок 16 — Зависимость активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от мутантных форм тропонина I. А. Активность актин-миозиновой-S1 АТФ-азы при различных концентрациях Ca^{2+} в присутствии нормальных (WT) и мутантных форм тропонина I в составе восстановленного белкового комплекса. Б. Активность актин-миозиновой-S1 АТФ-азы при различных концентрациях Ca^{2+} в присутствии мутантных форм тропонина I в составе изолированных мышечных волокон и в присутствии миозинсвязывающего белка С (MyBP-C C0C2). В. Активность актин-миозиновой-S1 АТФ-азы при различных концентрациях Ca^{2+} в составе восстановленного белкового комплекса, а также в присутствии миозинсвязывающего белка С (MyBP-C C0C2).

Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функции саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа.

С целью поиска генетических предикторов развития диастолической дисфункции и рестриктивного типа кровотока в группах пациентов с не генетически-обусловленными полигенными заболеваниями сердечно-сосудистой системы нами был проанализирован спектр генетических детерминант в группе пациентов с ХСН. В данную группу вошли 334 пациента с ХСН, 196 из них составляли мужчины (59%) и 138 женщины (41%). Среди причин развития ХСН основными являлись артериальная гипертензия и факторы кардиометаболического риска, а также ИБС. Никто из обследованных пациентов с ХСН не имел перенесённого ИМ в анамнезе, а также рубцовых изменений в миокарде по данным эхокардиографии. Клиническая характеристика и основные эхокардиографические параметры обследованных пациентов с ХСН представлены в Таблице 5.

Нами было оценено распределение аллелей и генотипов rs2270915 гена *NPR3*, rs2069542 и rs45554236 гена *MYH7*, rs942077 и rs35141404 гена *RBM20*, rs7124958, rs2290149, rs753992 и rs10838692 гена *MADD*. Данные полиморфные варианты были выбраны на основе анализа литературных данных и результатов собственных исследований. Поскольку rs45554236 был представлен в исследуемой и контрольной популяции в основном одним генотипом и, таким образом, представлял собой редкие полиморфный вариант с частотой минорного аллеля менее 1%, в дальнейшем он был исключен из анализа.

Таблица 5 — Клиническая характеристика и эхокардиографические параметры пациентов с ХСН

Показатели	Пациенты с ХСН (n=334)
Возраст, лет	55,75 ± 14,97
Пол	41% женщины, 59% мужчины
ХСН с сохранной фракцией выброса, ФВ ≥ 50%	205 (61%)
ХСН с ФВ 40—49 %	97 (29%)
ХСН со сниженной фракцией выброса, ФВ < 40%	32 (10%)
ИБС	145 (43%)
МЖП, мм	12,39 ± 1,27
ЗС ЛЖ, мм	11,75 ± 1,63
ИММ ЛЖ, г/м ²	145,62 ± 43,00
КДР, мм	51,28 ± 9,28
Увеличенное ЛП	273 (82%)
ЛП, мм	48,13 ± 8,34
Индекс ЛП, мм/м ²	24,01 ± 4,54
Фракция выброса (Simpson), %	48,66 ± 14,68

Для всех остальных исследуемых полиморфных вариантов (rs2270915, rs2069542, rs753992, rs942077, rs35141404, rs7124958, rs2290149, rs10838692) были исследованы ассоциации аллелей и генотипов с наличием в исследуемой группе диастолической сердечной недостаточности, рестриктивного типа наполнения левого желудочка, наличием гипертрофии миокарда и концентрическим и эксцентрическим её вариантом, а также наличием дилатации левого предсердия. Для сравнения частот аллелей и генотипов использовался критерий Хи-квадрат и точный критерий Фишера. Нами были получены достоверные различия в частоте распределения аллелей и генотипов rs942077 и rs3514140 гена *RBM20*, а также rs2290149 и rs10838692 гена *MADD* в зависимости от ряда клинических и функциональных параметров.

При анализе генетических вариантов в гене *RBM20* было выявлено, что генотип GG rs942077 ассоциирован с развитием систолической дисфункции у пациентов с ХСН, а генотип GG rs35141404 в группе с дилатацией левого предсердия встречался значительно реже по сравнению с контрольной группой.

Для генетического варианта rs2290149 гена *MADD* были обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов между контрольной группой и исследуемыми группами пациентов без рестриктивного типа наполнения левого желудочка (Таблица 6) и пациентов с гипертрофией левого желудочка (Таблица 7).

Таблица 6 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в зависимости от наличия рестриктивного фенотипа

Генотипы и аллели	Группа без рестриктивного фенотипа, % (n)	Группа с рестриктивным фенотипом, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	2,7% (7)	4,5% (3)	3,1% (10)	7% (27)
СТ	15,8% (41)	18,2% (12)	16,3% (53)	21,4% (82)
ТТ	81,5% (212)	77,3% (51)	80,6% (263)	71,6% (275)
p=0,00007				
p=0,00002				
С	10,6% (55)	13,6% (18)	11% (73)	18% (136)
Т	89,4% (465)	86,4% (114)	89% (579)	82% (632)
p=0,00007				
p=0,0008				
СТ+СС	18,5% (48)	22,7% (15)	19,4% (63)	28,4% (109)
ТТ	81,5% (212)	77,3% (51)	80,6% (263)	71,6% (275)
p=0,005				
p=0,0049				

Таблица 7 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в зависимости от наличия ГЛЖ

Генотипы и аллели	Группа без ГЛЖ, % (n)	Группа с ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	4% (2)	2,9% (8)	3% (10)	7% (27)
СТ	18% (9)	15,8% (44)	16,2% (53)	21,4% (82)
ТТ	78% (39)	81,3% (226)	80,8% (265)	71,6% (275)
p=0,00007				
p=0,000053				
С	13% (13)	11% (60)	11% (73)	18% (136)
Т	87% (87)	89% (496)	89% (538)	82% (632)
p=0,00007				
p=0,0005				
СС+СТ	22% (11)	18,7% (52)	19,2% (63)	28,4% (109)
ТТ	78% (39)	81,3% (226)	80,8% (265)	71,6% (275)
p=0,0046				
p=0,0001				

Также для rs2290149 была продемонстрирована разница между пациентами контрольной группы и группами пациентов с различными типами ГЛЖ (Таблица 8), а также пациентами с дилатацией левого предсердия (Таблица 9).

Таблица 8 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в зависимости от типа ГЛЖ

Генотипы и аллели	Не эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	2,5% (6)	3,5% (3)	2,8% (9)	7% (27)
СТ	18,2% (43)	10,6% (9)	16,1% (52)	21,4% (82)
ТТ	79,3% (188)	85,9% (73)	81,1% (261)	71,6% (275)
$p=0,00007$ $p=0,00034$ $p=0,00016$				
С	12% (55)	9% (15)	11% (70)	18% (136)
Т	88% (419)	91% (155)	89% (574)	82% (632)
$p=0,00007$ $p=0,0038$ $p=0,0036$				
СС+СТ	20,7%(49)	14,1% (12)	18,9% (61)	28,4% (109)
ТТ	79,3% (188)	85,9% (73)	81,1% (261)	71,6% (275)
$p=0,0046$ $p=0,006$				

Таблица 9 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН и дилатацией ЛП

Генотипы и аллели	Без дилатации ЛП, % (n)	С дилатацией ЛП, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	3,3% (2)	3% (8)	3% (10)	7% (27)
СТ	21,3% (13)	14,7% (40)	16% (53)	21,4% (82)
ТТ	75,4% (46)	82,3% (223)	81% (269)	71,6% (275)
$p=0,00007$ $p=0,00001$				
С	14% (17)	10% (56)	11% (73)	18% (136)
Т	86% (105)	90% (486)	89% (591)	82% (632)
$p=0,00007$ $p=0,0002$				
СС+СТ	24,6% (15)	17,7% (48)	19% (63)	28,4% (109)
ТТ	75,4% (46)	82,3% (223)	81% (269)	71,6% (275)
$p=0,0046$ $p=0,0016$				

Для генетического варианта rs10838692 гена *MADD* были обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов между контрольной группой и группой ХСН с сохранный ФВ (Таблица 10), а также между контрольной и исследуемой группами в зависимости от типа ГЛЖ и (Таблица 11).

Таблица 10 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в зависимости от типа ХСН

Генотипы и аллели	Сниженная ФВ, % (n)	Сохранный ФВ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	16,4% (20)	6% (12)	9,9% (32)	18,8% (72)
СТ	30,3% (37)	44% (88)	38,9% (125)	38% (146)
ТТ	53,3% (65)	50% (100)	51,2% (165)	43,2% (166)
$p < 10^{-9}$				
С	32% (77)	28% (112)	29% (189)	38% (290)
Т	68% (167)	72% (288)	71% (455)	62% (478)
$p = 0,0009$ $p = 0,0009$				
ТТ+СТ	83,6% (102)	94 (188)	90,1% (290)	81,2% (312)
СС	16,4% (20)	6% (12)	9,9% (32)	18,8% (72)
$p = 0,0036$				
$p = 0,0009$ $p = 0,0001$				

Таблица 11 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в зависимости от типа ГЛЖ

Генотипы и аллели	Не концентрический тип ГЛЖ, % (n)	Концентрический тип ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	11,7% (16)	8,5% (16)	9,9% (32)	18,8% (72)
СТ	36,8% (50)	40,4% (76)	38,9% (126)	38% (146)
ТТ	51,5% (70)	51,1% (96)	51,2% (166)	43,2% (166)
$p < 10^{-10}$ $p < 10^{-9}$				
С	30% (82)	29% (108)	29% (190)	38% (290)
Т	70% (190)	71% (268)	71% (458)	62% (478)
$p = 0,009$ $p = 0,0029$				
ТТ+СТ	88,3 (120)	91,5% (172)	90,1% (292)	81,2% (312)
СС	11,7% (16)	8,5% (16)	9,9% (32)	18,8% (72)
$p = 0,0009$ $p = 0,0013$				

Также для rs10838692 гена *MADD* были обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов между контрольной группой и пациентами с рестриктивным и нерестриктивным типом наполнения левого желудочка (Таблицы 12), а также группой пациентов с дилатацией ЛП (Таблица 13).

Таблица 12 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в зависимости от наличия рестриктивного фенотипа

Генотипы и аллели	Без рестриктивного фенотипа, % (n)	С рестриктивным фенотипом, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
CC	11,1% (29)	6,1% (4)	10,1% (33)	18,8% (72)
CT	35,5% (93)	53% (35)	39% (128)	38% (146)
TT	53,4% (140)	40,9% (27)	50,9% (167)	43,2% (166)
$p=0,00065$				
$p<10^{-9}$				
$p=0,0000061$				
C	29% (151)	33% (43)	30% (194)	38% (290)
T	71% (373)	67% (89)	70% (462)	62% (478)
$p=0,0014$				
$p=0,001$				
TT+CT	88,9% (233)	93,9% (62)	89,9% (295)	81,2% (312)
CC	11,1% (29)	6,1% (4)	10,1% (33)	18,8% (72)
$p=0,0014$				
$p=0,01$				
$p=0,0082$				

Таблица 13 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в зависимости от наличия дилатации ЛП

Генотипы и аллели	Группа без дилатации ЛП, % (n)	Группа с дилатацией ЛП, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
CC	14,8% (9)	8,8% (24)	9,9% (33)	18,8% (72)
CT	39,3% (24)	39,6% (108)	39,5% (132)	38% (146)
TT	45,9% (28)	51,6% (141)	50,6% (169)	43,2% (166)
$p<10^{-10}$				
$p<10^{-13}$				
C	34% (42)	29% (156)	30% (198)	38% (290)
T	66% (80)	71% (350)	70% (470)	62% (478)
$p=0,0012$				
$p=0,01$				
TT+CT	85,2% (52)	91,2% (249)	90,1% (301)	81,2% (312)
CC	14,8% (9)	8,8% (24)	9,9% (33)	18,8% (72)

Таким образом, нами выявлены различия в частоте распределения аллелей и генотипов между пациентами с ХСН и контрольной группой для полиморфных вариантов rs942077 и rs3514140 гена *RBM20*, а также rs2290149 и rs10838692 гена *MADD*. Наиболее важной представляется ассоциация между rs2290149 и rs10838692 гена *MADD* с наличием гипертрофии миокарда, диастолической дисфункции и с дилатацией ЛП. Так, встречаемость аллеля Т и генотипа ТТ rs2290149 значительно выше в группе пациентов с ХСН с сохранной фракцией выброса и в группе с ГЛЖ независимо от типа ремоделирования, а также среди пациентов с ХСН с дилатацией ЛП по сравнению с группой контроля. В генах *MADD* и *RBM20* не выявлено генетических вариантов, ассоциированных с развитием рестриктивного фенотипа в исследуемой группе пациентов с ХСН.

Выводы

1. При использовании технологии массивного параллельного секвенирования патогенные и вероятно-патогенные генетические варианты определяются у 74% пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией. Доля таких вариантов в генах саркомерных и цитоскелетных белков сопоставимы и составляют 40 и 34%, в 22% случаев наблюдается сочетание патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов в генах саркомерных белков с вариантами неопределенной значимости в генах белков цитоскелета.
2. Манифестация рестриктивной кардиомиопатии на фоне патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе саркомерных генов ассоциирована с наиболее низкими показателями десятилетней выживаемости. Наихудший прогноз заболевания определяется в группе пациентов с постоянной формой фибрилляции предсердий, наличие которой определяет 54% порог пятилетней бестрансплантационной выживаемости.
3. Течение идиопатической рестриктивной кардиомиопатии с манифестацией в детском возрасте в 40% случаев характеризуется фенотипической трансформацией и сочетанием с признаками некомпактного миокарда и врожденными пороками сердца. Наихудший прогноз наблюдаются в группе пациентов с дебютом заболевания в возрасте до 5 лет, где медиана времени жизни от начала заболевания составляет 2 года, что в 5 раз меньше по сравнению с остальной группой пациентов.
4. Прогностические шкалы SHFM, MAGGIC, 3С-HF и MUSIC для расчета риска неблагоприятного исхода хронической сердечной недостаточности обладают высокой точностью в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией при разделении групп пациентов, достигших и не достигших конечной точки в течение 1 года. Наибольшей чувствительностью и специфичностью в группе пациентов с рестриктивной кардиомиопатией обладают шкалы, включающие фактор наличия фибрилляции предсердий и структурные параметры левого предсердия, генотип пациента не вносит существенного вклада в определение риска

неблагоприятного исхода хронической сердечной недостаточности в течение 1 года.

5. При сочетании рестриктивной кардиомиопатии с нейромышечной симптоматикой заболевание ассоциировано с мутациями в генах цитоскелетных белков, а мутации в гене *FLNC* являются наиболее частой причиной развития данного клинического фенотипа (60%) и составляют 20% от всех случаев генетически обусловленной рестриктивной кардиомиопатии.
6. При исследовании *in vitro* мутаций в гене десмина, ассоциированных с развитием кардиомиопатий, наблюдается нарушение структуры и функции митохондрий, снижение функции клеточного дыхания, нарушение митохондриального захвата кальция и продукции АТФ.
7. При исследовании *in vitro* мутаций в гене ламина, определяется нарушение дифференцировочного потенциала стромальных стволовых клеток в миогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, снижение активности гистоновых деацетилаз и нарушение эпигенетической регуляции стволовых клеток.
8. Молекулярные механизмы развития тропонин-I-ассоциированной рестриктивной кардиомиопатии включают сниженную инкорпорацию мутантных форм тропонина в тонкие филаменты, их усиленное связывание с тропомиозином и увеличение чувствительности к ионам кальция.
9. У пациентов с хронической сердечной недостаточностью, не ассоциированной с идиопатическими формами кардиомиопатий, генотип ТТ и аллель Т rs2290149 и генотип ТТ rs10838692 гена *MADD* ассоциированы с развитием сердечной недостаточности с сохранной фракцией выброса, диастолической дисфункции и гипертрофией миокарда, а генотип GG rs942077 гена *RBM20* — с развитием сердечной недостаточности на фоне сниженной фракции выброса и эксцентрическим типом ремоделирования миокарда. В данной группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью не выявлено генетических вариантов в генах *MADD* и *RBM20*, ассоциированных с развитием рестриктивного фенотипа.

Практические рекомендации

1. Пациентов с дебютом идиопатической рестриктивной кардиомиопатии в возрасте до 5 лет, пациентов с рестриктивной кардиомиопатией на фоне патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе саркомерных генов, а также пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией, осложненной постоянной формой фибрилляции предсердий, рекомендовано рассматривать в качестве потенциальных кандидатов для проведения ортотопической трансплантации сердца.

2. Для оценки риска развития летального исхода вследствие хронической сердечной недостаточности в течение года у пациентов с

идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии возможно использование прогностических шкал SHFM, MAGGIC, 3С-HF и MUSIC.

3. В качестве наиболее информативной шкалы оценки риска развития летального исхода у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии рекомендовано использование шкалы 3С-HF.

4. В группе пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии целесообразно проведение оценки риска развития желудочковых нарушений ритма и определение показаний к своевременной установке имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора.

5. Для оценки семейного анамнеза и определения семейных случаев заболевания у членов семей пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии в качестве признаков проявления заболевания рекомендовано рассматривать не только рестриктивную кардиомиопатию, но и наличие врожденных пороков сердца, нарушений ритма и проводимости, а также признаков некомпактного миокарда левого желудочка.

6. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс нейромышечной системы пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение детального неврологического обследования, включающего клиническую оценку, электронейромиографию и определение уровня общей фракции креатинфосфокиназы при биохимическом исследовании.

7. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс сердечно-сосудистой системы пациентам с врожденными и генетически обусловленными формами миопатий показано проведение суточного мониторирования ЭКГ и ЭхоКГ с доплеровским анализом.

8. Пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение широкого генетического обследования для установления этиологической причины заболевания и последующего каскадного скрининга членов семьи пробанда.

9. Для установления генетической причины заболевания пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение генетического тестирования методом массового параллельного секвенирования с использованием целевых панелей генов.

10. Для установления генетической причины заболевания у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии не показано использование секвенирования по методу Сенгера, а также проведение полноэкзомного секвенирования в качестве методов «первой линии» диагностического поиска.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Kiselev, A. De novo mutations in FLNC leading to early-onset restrictive cardiomyopathy and congenital myopathy / Kiselev A, Vaz R, Knyazeva A, [et al.] //Hum Mutat. -2018.- Vol. 39.-C.1161-1172.
2. Khudiakov, A. Generation of iPSC line from patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy carrying mutations in PKP2 gene / Khudiakov A, Kostina D, Zlotina F& , [et al.] // Stem Cell Res.-2018.-Vol. 24.-C.85-88.
3. Perepelina, K. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling/ Perepelina K, Dmitrieva RI, Ignatieva E [et al.] //Biochem Cell Biol. -2017.- Vol.96.-C.342-348.
4. Khudiakov, A. Generation of iPSC line from desmin-related cardiomyopathy patient carrying splice site mutation of DES gene/. Khudiakov A, Kostina D, Zlotina A. [et al.] // Stem Cell Res. -2017.-Vol. 24.-C. 77-80.
5. Tarnovskaya, S. Structural consequences of mutations associated with idiopathic restrictive cardiomyopathy/ Tarnovskaya S, Kiselev A, Kostareva A. [et al.] // Amino Acids.-2017 .-Vol.49.-C.1815-1829.
6. Smolina, N. Assaying Mitochondrial Respiration as an Indicator of Cellular Metabolism and Fitness/ Smolina N, Bruton J, Kostareva A, [et al.] // Methods Mol Biol.- 2017.-Vol.1601.-C. 79-87.
7. Kostareva, A. Genetic Spectrum of Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Uncovered by Next-generation Sequencing/ Kostareva A., Artem Kiselev, Gudkova A, [et al.] //PLOS One.- 2016.-Vol.-11.-C.e0163362
8. Kiselev, A. Progressive cardiac conduction disease associated with a DSP gene mutation / Kiselev A, Mikhailov E, Parmon E, [et al.] // Int J Cardiology.- 2016.- Vol.216-C.188-189.
9. Malashicheva, A. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner/ Anna Malashicheva, Maria Bogdanova, Arsenii Zabirnyk,., [et al.]// Mol Gen Metab.- 2016.-Vol.115.-C.118-27
10. Smolina, N. Primary murine myotubes as a model for investigating muscular dystrophy/ Natalia Smolina, Anna Kostareva, Joseph Bruton, [et al.] // Biomed Res Int.- 2015.-Vol.2015.- 594751
11. Pervunina, T. Neonatal hypertrophic cardiomyopathy caused by double mutation in RAS pathway genes/ Pervunina T, Vershinina T, Kiselev A, [et al.] // Int J Cardiol.- 2015.-Vol.-184.-C. 272-273
12. Khodyuchenko, T. Congenital heart defects are rarely caused by mutations in cardiac and smooth muscle actin genes/ Khodyuchenko T., Zlotina A., Pervunina T. [et al.] // Biomed Res International.- 2015.-C.127807
13. Smolina, N. Aggregate-prone desmin mutations impair mitochondrial calcium uptake in primary myotubes/ Smolina N, Bruton J, Sjoberg G. [et al.] // Cell Calcium. -2014.-Vol. 56.-C.269-75

14. Kostareva, A. Genetic spectrum of cardiomyopathies with neuromuscular phenotype./ Kostareva A, Sejersen T, Sjoberg G. // Front Biosci.- 2013.-Vol.-5.-C. 325-40.
15. Gudkova, A. Diagnostic Challenge in Desmin Cardiomyopathy With Transformation of Clinical Phenotypes/ Gudkova A, Kostareva A, Sjoberg G [et al.] // Pediatric Cardiology.- 2012.-Vol.34.-C.467-70
16. Kostareva, A. A213V substitution represents a rare polymorphism but not a mutation and is more prevalent in patients with heart dilation of various origins/ Kostareva A, Sjoberg G, Gudkova A. [et al.] // Acta Myologica.- 2011.- Vol.30.-C. 42-5.
17. Kostareva, A. Deletion in TNNI3 gene is associated with restrictive cardiomyopathy/ Kostareva A, Gudkova A, Sjöberg G, [et al.] // Int J Cardiol.- 2009.-Vol. 131.- 410-412
18. Kostareva, A. Mice expressing L345P mutant desmin exhibit morphological and functional changes of skeletal and cardiac mitochondria/ Kostareva A, Sjöberg G, Bruton J, [et al.] // J Muscle Res Cell Motil. -2008.- Vol.29.-C.25-36
19. Kostareva, A. Desmin mutations in a St.Petersburg cohort of cardiomyopathies/ Kostareva A, Gudkova A, Sjoberg G, [et al.] // Acta Myologica.- 2006.- Vol.25.- C109-15
20. Goudeau B. Variable pathogenic potentials of mutations located in the desmin alpha-helical domain/ Goudeau B, Rodrigues-Lima F, Fischer D, [et al.] // Hum Mutat.- 2006.- Vol.27.-C.906-13.
21. Полубояринова, О. Ю. Клинико-морфологические признаки РКМП, связанные с мутацией в гене FLNC / О.Ю. Полубояринова, А. А. Князева, М. Ю. Ситникова [и др.] // Трансляционная медицина. -2018. — Т.5. —№ 3. С. — 15-22.
22. Князева, А.А. Реализация эффективного метода стабильной экспрессии гена FLNC в клетках линии С2С12/ А.А. Князева, А.А. Худяков, А. А. Костарева [и др.] //Трансляционная медицина. —2018. — Т. 5. — № S3. — С. 283.
23. Лясникова, Е. А. Генетические детерминанты, ассоциированные с развитием и прогнозом постинфарктного ремоделирования и хронической сердечной недостаточности / Е. А. Лясникова, А. М. Улитин, В. А. Тишкова [и др.] // Трансляционная медицина.—2018. —Т.5.— № 1. —С. 15-24.
24. Костарева, А.А. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии / А. А. Костарева, А. Я. Гудкова, Т. М. Первунина [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. —2017. — № 1. — С. 39-46.
25. Полякова, А.А. Ассоциация полиморфных вариантов генов MADD и MYH7 и гипертрофической кардиомиопатии у пациентов старше 45 лет / А. А. Полякова, В. Г. Давыдова, А. А. Стрельцова [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. —2017. — № 1. — С. 47-54.
26. Перепелина, К.И. Влияние мутаций в гене LMNA на миогенную дифференцировку. Первичных сателлитных клеток и клеток линии С2С12 / К. И. Перепелина, Н. А. Смолина, А. С. Забирник [и др.] //Цитология. — 2017. — Т. 59. — № 2. — С. 117-124.

27. Малашичева, А.Б. Изучение механизмов возникновения кардиомиопатий при помощи индуцированных плюрипотентных клеток / А. Б. Малашичева, А. А. Костарева, А. А. Худяков // Гены и Клетки. —2017. — Т. 12. — № 3. — С. 155.
28. Князева, А.А. Экспрессия генов, кодирующих белки Z-диска, при гипертрофии миокарда, вызванной реноваскулярной гипертензией в модели «2 kidney 1 clip» / А. А. Князева, Н. А. Смолина, И. Ю. Кашерининов [и др.] // Трансляционная медицина. —2017. — Т. 4. — № 5. — С. 61-68.
29. Богданова, М.А. Роль ядерных ламинов А/С в остеогенной дифференцировке мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / М. А. Богданова, А. Я. Гудкова, А. С. Забирник [и др.] // Цитология. —2014. — Т. 56. — № 4. — С. 260-267.
30. Смолина, Н.А. Сравнительная оценка методов получения функционально-активных дифференцированных мышечных клеток / Н. А. Смолина, А.Я. Давыдова, И. А. Щукина [и др.] // Цитология. —2014. —Т. 56. — № 4. —С. 291-299.
31. Гудкова, А.Я. Мутации и редкие варианты гена десмина в качестве причины развития различных вариантов кардиомиопатий / А. Я. Гудкова, Н. А. Смолина, Е. Н. Семернин [и др.] // Трансляционная медицина. —2014. — № 3. — С. 62-72.
32. Малашичева, А.Б. Мутации в гене ламина А/С изменяют дифференцировочный потенциал стромальных клеток жировой ткани / А. Б. Малашичева, А. С. Забирник, Н. А. Смолина [и др.] // Цитология. —2013. — Т. 55. — № 5. — С. 313-317.
33. Худяков, А.А. Сравнение эффективности методов получения функционально активных кардиомиоцитов человека / А. А. Худяков, Д. И. Курапеев, А. А. Костарева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. —2013. — Т. 8. — № 2. — С. 47-55.
34. Рыбакова, М.Г. Десминовая кардиомиопатия / М. Г. Рыбакова, И. А. Кузнецова, А. Я. Гудкова [и др.] // Архив патологии. —2011. —Т. 73. — № 4. —С. 56-59.
35. Шляхто, Е.В. Кардиомиопатии, связанные с мутациями гена десмина / Е. В. Шляхто, А. А. Костарева, Е. Н. Семернин [и др.] // Артериальная гипертензия. —2008. — Т. 14. — № 2. — С. 56.