

На правах рукописи

ВАХРУШЕВ

Юрий Алексеевич

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОЛИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ТАЙТИНА (*TTN*) В ОЦЕНКЕ
РИСКА РАЗВИТИЯ И ПРОГНОЗА СЕРДЕЧНО – СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ**

3.1.20. Кардиология

1.5.7. Генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург

2024

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

Научный руководитель:

Костарева Анна Александровна – доктор медицинских наук

Официальные оппоненты:

Куликов Александр Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра пропедевтики внутренних болезней с клиникой, заведующий кафедрой

Назаренко Мария Сергеевна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», научно-исследовательский институт медицинской генетики, лаборатория популяционной генетики, руководитель

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «24» июня 2024 года в 13.15 на заседании диссертационного совета 21.1.028.02 (Д 208.054.04) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197341, Санкт-Петербург, ул.Аккуратова, д.2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197341, Санкт—Петербург, ул. Аккуратова, д. 2, www.almazovcentre.ru).

Автореферат разослан « » 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
21.1.028.02 (Д208.054.04),
доктор медицинских наук, профессор

Недошивин Александр Олегович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Долгое время кардиомиопатии (КМП) оставались наименее изученными заболеваниями миокарда с точки зрения этиопатогенеза. Развитие методов генетической диагностики, в особенности секвенирования нового поколения, привело к открытию генов, мутации в которых вызывают развитие данной патологии. К ним относятся гены, кодирующие белки саркомера, клеточной мембраны, цитоскелета, вставочных дисков и ионных каналов. Среди них – ген тайтина (*TTN*) - белка, придающего саркомеру пассивную жесткость, а также выполняющего ряд других функций (Miller E., 2013).

Мутации в гене *TTN*, приводят к снижению устойчивости структуры и неправильному формированию саркомера, а также аномальной сборке миофибрилл. После описания ассоциации мутаций *TTN* с развитием КМП и раскрытия большого количества его функций в саркомере, было предположено, что нарушения в структуре тайтина также могут опосредовать и модулировать течение других патологических процессов в сердце, в частности, ремоделирование миокарда и развитие систолической и диастолической дисфункции. Стоит заметить, что примерно у 1–3% людей в общей популяции имеются тайтин–укорачивающие варианты гена (*TTNtv*) в гетерозиготном состоянии (Ware J., 2018). Их сочетание с однонуклеотидными вариантами или мутациями в других генах, а также присутствие в гомозиготном состоянии или в комбинации с токсическим и гемодинамическим воздействием приводит к развитию различных патологических процессов (Haas J., 2015). Также на сегодняшний день известно, что варианты в гене *RBM20*, кодирующем одноименный фактор сплайсинга молекулы тайтина, также приводят к развитию КМП со схожей клинической картиной. На сегодняшний день роль белка *RBM20* в патогенезе КМП остается не до конца изученной, так как было проведено лишь небольшое количество исследований с целью изучения молекулярных механизмов регуляции сплайсинга посредством данной молекулы.

Для полномасштабного исследования эффектов вариантов в гене *TTN*, существуют объективные сложности, связанные с детекцией и интерпретацией данных молекулярно–генетического анализа. Кроме того, функциональная проверка мутаций гена *TTN* представляет собой сложность из-за размеров гена, огромного количества индивидуальных вариантов и их равномерного распределения в структуре гена. Так, фактически каждый человек может нести по крайней мере один редкий или индивидуальный вариант в гене *TTN*, что крайне затрудняет клиническую интерпретацию получаемых данных генетической диагностики и их использование в кардиологической практике.

В рамках данной работы изучалась взаимосвязь между наличием и характером вариантов в данном гене, возникновением и течением врожденной патологии сердца, а также особенностями ремоделирования миокарда в постинфарктном периоде. Для этого были исследованы различные клинические когорты пациентов на предмет носительства различных вариантов в гене *TTN*. Результаты были сопоставлены с данными, полученными на контрольной выборке пациентов, что также позволило определить спектр и характер вариантов в гене *TTN* в относительно здоровой популяции. Поскольку ранее подобных отечественных работ не проводилось, сопоставления частот различных вариантов в гене *TTN* с данными международных баз данных приобретает особую актуальность.

В результате выполненной работы были получены новые данные о частоте и характере вариантов в гене *TTN* в популяции жителей Санкт-Петербурга, охарактеризован спектр вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в качестве причин развития первичных кардиомиопатий, спектр вариантов в вышеназванных генах при КМП, обусловленных мутациями в других генах и их вклад в течение заболевания и его клиническую картину, а также роль вариантов в гене *TTN* и *RBM20* в течение процесса ремоделирования миокарда при развитии постинфарктного кардиосклероза и возникновении фибрилляции предсердий.

Цель исследования

Охарактеризовать спектр генетических вариантов в генах *TTN* и *RBM20* и их вклад в особенности клинической картины и прогноза заболевания у пациентов с генетически-обусловленной и приобретенной патологией сердечно-сосудистой системы.

Задачи исследования

1. В группе пациентов с различными формами кардиомиопатий определить спектр точечных и укорачивающих вариантов в генах *TTN* и *RBM20* и охарактеризовать их патогенную роль, а также связь с особенностями клинической картины заболевания.
2. Определить частоту и спектр точечных, укорачивающих вариантов и вариантов в сайтах сплайсинга в генах *TTN* и *RBM20* в популяции жителей Санкт-Петербурга и сопоставить полученные показатели с информацией, представленной в международных базах данных.
3. В группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью определить спектр и частоту точечных и укорачивающих вариантов в генах *TTN* и *RBM20*, полиморфных вариантов *RBM20* и их связь с различными фенотипами хронической сердечной недостаточности, структурными параметрами левого предсердия и наличием фибрилляцией предсердий.
4. Проанализировать распределение выявленных генетических вариантов в доменной структуре тайтина и сравнить данное распределение в группах пациентов с различными формами кардиомиопатий, группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, осложненным хронической сердечной недостаточностью разных фенотипов и в популяции жителей Санкт-Петербурга.

Научная новизна работы

Определен спектр однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* и *RBM20*, а также спектр *TTN*_{iv} и вариантов в сайтах сплайсинга в популяции жителей Санкт-Петербурга. Установлен спектр и частота однонуклеотидных, укорачивающих вариантов и вариантов в сайтах сплайсинга у пациентов с различными типами кардиомиопатий. Показано преобладание вариантов в гене *TTN* у пациентов с дилатационным фенотипом кардиомиопатий и описаны особенности течения дилатационной кардиомиопатии у пациентов детского возраста на фоне мутаций в гене *RBM20*.

Впервые описан спектр и частота однонуклеотидных и укорачивающих вариантов в гене *TTN* в группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, осложненным хронической сердечной недостаточностью, а также продемонстрирована связь укорачивающих форм в гене *TTN* с формированием хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса.

Показана преимущественная локализация укорачивающих вариантов в гене *TTN* у пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в области А-зоны тайтина и в экзонах с более высокой степенью экспрессии по сравнению с пациентами как контрольной группы.

Теоретическая и практическая значимость

Охарактеризованы спектр, распространенность и структурно-функциональный эффект генетических вариантов *TTN* и *RBM20* в условно-здоровой группе жителей Санкт-Петербурга с использованием метода высокопроцессивного секвенирования, что позволит использовать данную информацию для анализа патогенности и причинной значимости генетических вариантов при различных формах кардиомиопатий, нарушений ритма и других заболеваниях сердечно-сосудистой системы.

Расширен спектр сердечно-сосудистых заболеваний, для которых доказан этиопатогенетический вклад вариантов в гене тайтина, в частности, показана их значимость в течение постинфарктного ремоделирования и вероятности формирования хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса. Данная информация может быть использована для персонифицированного подхода при определении прогноза и стратификации групп рисков у пациентов, перенесших инфаркт миокарда.

Продемонстрировано, что, в отличие от группы пациентов с кардиомиопатиями, в группе пациентов с инфарктом миокарда и хронической сердечной недостаточностью варианты в генах *TTN* и *RBM20* не ассоциированы с развитием фибрилляции предсердий при одномоментном наблюдении на сроках от 6 до 24 месяцев после перенесенного инфаркта миокарда. Полученные результаты определяют направление дальнейших исследований роли вариантов вышеуказанных генов в формировании постинфарктного ремоделирования в сочетании с фибрилляцией предсердий в условиях длительного проспективного наблюдения после острого инфаркта миокарда.

Данные о преобладающей локализации ассоциированных с заболеваниями и нарушающих синтез полноразмерного белка вариантов в гене *TTN* в структуре А-зоны подчеркивают фундаментальную значимость данного фрагмента белковой молекулы тайтина в формировании дилатационного фенотипа миокарда и нарушении процессов механотрансдукции.

Методология и методы исследования

В исследовании были использованы методы проспективного наблюдения и одномоментного анализа. В качестве контрольной группы были обследованы мужчины, жители Санкт-Петербурга (n=192) из исследования «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации». Учитывая гендерные особенности факторов риска развития ишемической болезни сердца, возрастные и половые различия по формированию фенотипа сердечной недостаточности и тяжести ее течения, в исследование были включены только мужчины с данной патологией, и соответственно контрольная группа была набрана из мужчин. При этом согласно международным базам данных существенного различия в частоте вариантов в гене *TTN* между мужчинами и женщинами нет.

Формирование когорты пациентов с кардиомиопатиями происходило на основании критериев включения и невключения. Главным критерием включения являлся диагноз идиопатической кардиомиопатии, который устанавливался в соответствии с критериями Всемирной

организации здравоохранения и классификацией Европейского общества кардиологов 1996 года (Richardson P., 1996). В ходе базового клинического обследования проводилась верификация диагноза, в частности исключение вторичных кардиомиопатии, возникших в результате чрезмерного употребления алкоголя, приема наркотических веществ и антрациклинов. Критериями невключения являлись наличие приобретенных причин кардиомиопатии, таких как AL-амилоидоз, констриктивный перикардит, карциноид, предшествующее лучевое воздействие. В исследуемую группу пациентов с кардиомиопатиями вошел 251 пациент с диагнозом первичной кардиомиопатии, проходивший обследование и лечение на базе кардиологических и педиатрических отделений 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 Американского колледжа медицинской генетики и геномики, а также рекомендациями Российского общества медицинской генетики (Richards S., 2015; Рыжкова О.П., 2019). Критерием включения в группу пациентов с хронической сердечной недостаточностью являлось наличие у пациента соответствующей патологии в соответствии с рекомендациями Российского кардиологического общества (Терещенко С.Н., 2020), развившейся на фоне перенесенного инфаркта миокарда. Критериями невключения в группу являлись: первичные кардиомиопатии, вторичные кардиомиопатии, кардиомиопатии, ассоциированные с системными заболеваниями и различными типами амилоидоза, миокардит. В данную группу вошло 494 пациента с хронической сердечной недостаточностью.

Основные положения, выносимые на защиту

1. У пациентов с различными формами кардиомиопатий определяется преобладание укорачивающих вариантов в гене *TTN*, которые преимущественно соответствуют локализации в А-зоне тайтина, располагаются в экзонах с высокой представленностью в белковой структуре и имеют более высокие по сравнению с пациентами контрольной группы значения патогенности. Наиболее часто укорачивающие варианты в гене *TTN* приводят к развитию дилатационного фенотипа, некомпактного миокарда левого желудочка, а также характеризуются трансформацией фенотипов кардиомиопатии. Патогенные и вероятно патогенные варианты в гене *RBM20* наиболее часто вызывают развитие тяжелых форм дилатационной кардиомиопатии с дебютом заболевания в детском возрасте.
2. Частота точечных вариантов, укорачивающих вариантов и вариантов в сайтах сплайсинга в генах *TTN* и *RBM20* в популяции жителей Санкт-Петербурга соответствует значениям, представленным в международных базах данных и значимо от них не отличаются. Идентифицируемые в контрольной популяции укорачивающие варианты *TTN* локализуются преимущественно вне А-зоны белка и соответствуют экзонам с низким уровнем экспрессии в кардиальных изоформах тайтина.
3. В группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и хронической сердечной недостаточностью укорачивающие варианты в гене *TTN* ассоциированы со снижением сократительной функции миокарда и в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга ассоциированы с более высокой встречаемостью хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса. Укорачивающие варианты в гене *TTN* и полиморфные варианты в гене *RBM20* не

ассоциированы со структурными и функциональными параметрами левого предсердия на сроках одномоментного наблюдения 6-24 мес. после перенесенного острого инфаркта миокарда.

4. Для редких точечных и укорачивающих вариантов в гене *TTN* выявляемых в группах у пациентов с кардиомиопатиями и хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса характерна высокая представленность в участках, соответствующих А-зоне белка и в экзонах с высоким уровнем включения в белковую молекулу.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Степень достоверности и обоснованности положений, выносимых на защиту, представленных в диссертации, обеспечена применением адекватных и современных молекулярно-генетических и клинических методов, выбором корректных статистических методов для исследуемых выборок для обработки полученных результатов исследований. Диссертация выполнена в рамках основного плана научно-исследовательских работ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 10 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.

Личный вклад автора в диссертационное исследование

Автор самостоятельно выбрал направление исследования, определил цели и задачи, проанализировал литературу по теме диссертации. Автор лично осуществил набор пациентов и провел их генетическое исследование. Весь материал, представленный в диссертации, описан лично автором, а также проведён анализ полученных результатов, все выводы и практические рекомендации основаны на полученных результатах.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования внедрены в практическую работу центральной клинико-диагностической лаборатории и учебный процесс кафедры клинической лабораторной медицины с клиникой ИМО ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, циклы профессиональной переподготовки по специальности «Лабораторная генетика».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 194 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, клинических примеров, списка сокращений, списка литературы. Работа содержит 41 таблицу, 34 рисунка. Список литературы состоит из 202 источников: 11 отечественных и 191 иностранного.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследований

Распределение вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в популяции жителей Санкт-Петербурга

В результате проведения секвенирования нового поколения в контрольной группе (n=192) всего было выявлено 2002 точечных генетических варианта, из них только 31 имели частоту встречаемости менее 0,1% (29 в гене *TTN* и 2 в гене *RBM20*). Их распределение по генам и типам нуклеотидных замен показано в Таблице 1. Также было найдено 5 делеций со сдвигом рамки считывания, 69 вариантов в сайтах сплайсинга и 5 инсерций и делеций без сдвига рамки считывания (NF ins/del), 18 из них имели частоту встречаемости менее 5% (Таблица 2). Частота *TTN*tv в условно-здоровой популяции таким образом составила 2,6%, что соответствует данным международных исследования. Частота вариантов в сайтах сплайсинга составила 4,2%. Частота NF ins/del составила 2,6%.

Таблица 1 – Распределение однонуклеотидных вариантов в контрольной группе (n=192)

Ген	Тип варианта	Кол-во с частотой менее 5%	Кол-во с частотой менее 0,1%
<i>RBM20</i>	Однонуклеотидные	4	2
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные	418	29

Таблица 2 – Распределение укорачивающих вариантов в гене *TTN*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерции и делеции без сдвига рамки считывания в контрольной группе (n=192) по характеру изменения генотипа

Тип варианта		Общее количество	Кол-во с частотой менее 5%
Всего <i>TTN</i> tv		5	5
<i>Из них</i>	Делеция/инсерция со сдвигом рамки считывания	5	5
<i>Из них</i>	Нонсенс варианты	0	0
Вариантов в сайте сплайсинга		69	8
<i>Из них</i>	Замена в сайте сплайсинга	68	7
<i>Из них</i>	Инсерция в сплайс-сайте	1	1
Делеция/инсерция без сдвига рамки считывания		5	5
Итого		79	18
Примечание: <i>TTN</i> tv – укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i> .			

Если рассматривать найденные однонуклеотидные варианты с точки зрения их патогенности, то патогенных и вероятно патогенных вариантов обнаружено не было, большинство из них согласно

классификации Американского колледжа генетики и геномики (ACMG) принадлежало к группе вероятно доброкачественных вариантов (Таблица 3).

Таблица 3 – Распределение однонуклеотидных вариантов с частотой менее 0,1% в контрольной группе согласно классификации Американского колледжа генетики и геномики

Степень патогенности	Количество
Патогенные/вероятно патогенные	0 (0%)
Неопределенной значимости	3 (10,3%)
Вероятно доброкачественные	23 (79,4%)
Доброкачественные	3 (10,3%)

Таким образом, частота однонуклеотидных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в условно-здоровой популяции жителей Санкт-Петербурга составила 15,1% и 1% соответственно. Найденные однонуклеотидные варианты располагались по всей длине молекулы тайтина, что соответствует данным международных регистров. При этом половина из них (15) располагалась в области I-зоны, экзоны которой имеют низкий показатель процента сплайсинга в изоформе N2B и транскриптах Novex 1–3. Среднее значение процента сплайсинга (PSI) для однонуклеотидных вариантов составило $67,7 \pm 41,8\%$. С точки зрения распределения по структуре молекулы тайтина, 11 из них были обнаружены в доменах фибронектина типа 3, и 6 – в иммуноглобулин-подобных доменах.

Средний уровень PSI *TTN**tv* в контрольной группе составил $52,2 \pm 48,3\%$. Средний уровень PSI вариантов в сайтах сплайсинга в контрольной группе составил $99,5 \pm 1,4\%$. Средний уровень PSI инсерций и делеций без сдвига рамки считывания составил $40,6 \pm 54,2\%$. При сравнении непосредственно частоты встречаемости определенных типов генетических вариантов в контрольной группе с данными, представленными в международных исследованиях и базах данных, значимых отклонений обнаружено не было, что подчеркивает репрезентативность исследуемой нами популяции для оценки вариантов в генах *TTN* и *RBM20* (Таблица 4).

Таблица 4 – Сравнение частоты генетических вариантов в контрольной группе с частотой менее 0,1% с данными международных исследований

Ген	Тип мутации	Частота в контрольной группе (n=192)	Частота согласно базе GnomAd
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные варианты	15,1%	16,5%
<i>TTN</i>	Делеция/инсерция без сдвига рамки	0,5%	0,15%
<i>TTN</i>	Варианты в сайтах сплайсинга	1,6%	2%
<i>TTN</i>	<i>TTN</i> <i>tv</i>	2,6%	3%

Примечание: *TTN**tv* – укорачивающие варианты в гене *TTN*.

Найденные варианты распределялись по структуре белка тайтина неравномерно: 4 варианта располагались в I-зоне белка, 4 – в A-зоне, и по два в области Z-диска и M-линии (Рисунок 1).

Далее была проведена оценка распределения укорачивающих вариантов по структуре гена тайтина и проведено сравнение с данными международных исследований (Рисунок 1).

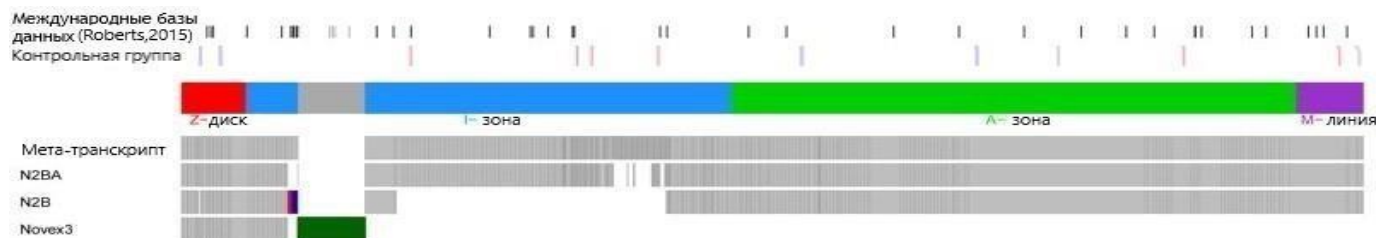


Рисунок 1 – Сравнение распределения генетических вариантов по структуре гена тайтина в контрольной группе по сравнению с данными международных исследований

Нами было показано, что частота однонуклеотидных вариантов (с частотой встречаемости 0,1% и менее) в условно-здоровой популяции жителей Санкт-Петербурга составляет 15,1% в гене *TTN* и 1% в гене *RBM20*. При этом однонуклеотидные варианты в гене *TTN* встречались у 13,5% индивидуумов. Согласно международным базам данных gnomAD и ExAC однонуклеотидные варианты в гене *TTN* встречаются у 16,5% и 17,1% индивидуумов соответственно (Akinrinade O., 2019). Частота *TTN*tv и вариантов в сайтах сплайсинга с частотой минорного аллеля менее 5% в исследованной нами контрольной группе составила 2,6% и 4,2%, соответственно, среди них отсутствовали патогенные и вероятно патогенные варианты. Все выявленные как однонуклеотидные варианты, так и *TTN*tv и варианты в сайтах сплайсинга, были распределены равномерно по структуре гена *TTN*.

Спектр вариантов в генах *TTN* и *RBM20* среди пациентов с различными типами кардиомиопатий

На следующем этапе исследования нами была поставлена задача оценить вклад редких форм генов *TTN* и *RBM20* в процесс ремоделирования миокарда при различных врожденных и приобретенных заболеваниях сердца. На первом этапе нами была проанализирована группа из 251 пациента с различными типами КМП, в том числе ДКМП (n=63), ГКМП (n=53), РКМП (n=72), АКМП (n=33) и некомпактного миокарда (НМ) (n=30). Из 251 пациента данной группы 105 были детского возраста. Данным пациентам для поиска причинных вариантов было проведено генетическое исследование с применением высокопроцессивного секвенирования с использованием панели генов, наиболее часто ассоциированных с развитием КМП (n=172).

При проведении целевого секвенирования пациентов с различными типами КМП в генах *TTN* и *RBM20* было найдено 25 патогенных и вероятно патогенных варианта, а также 4 однонуклеотидных и укорачивающих варианта неопределенной значимости, которые с большой вероятностью могут являться причинными в отношении наблюдаемого заболевания. Наибольшее количество вариантов было обнаружено у пациентов с ДКМП (n=16, 25,4%, 13 вариантов в *TTN* и 3 в *RBM20*). Среди пациентов остальных групп наблюдалась сходная частота вариантов в *TTN* и *RBM20* (РКМП – n=6, 8,3%, АКМП– n=3, 9,1% и НМ – n=2, 6,7%). В группе пациентов с ГКМП был обнаружен только один вероятно-патогенный вариант в гене *TTN*.

Спектр непатогенных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* у пациентов с кардиомиопатиями и причинными вариантами в других генах

На следующем этапе работы в той же группе пациентов с КМП нами был проведен дополнительный анализ вариантов в генах *TTN* и *RBM20* с частотой менее 0,1% для однонуклеотидных вариантов и менее 5% для укорачивающих вариантов на предмет их возможной ассоциации с фенотипическими проявлениями и клиническим течением заболевания. Для удобства изложения далее в этом и последующих разделах такие варианты обозначаются как «сопутствующие». Патогенные укорачивающие варианты в гене *TTN*, а также патогенные однонуклеотидные варианты в генах *TTN* и *RBM20* были рассмотрены в предыдущем разделе. Нами было выявлено 408 генетических вариантов, из них 401 в гене *TTN*, в том числе 29 укорачивающих варианта (24 нонсенс варианта, 5 делеций и инсерций со сдвигом рамки считывания) (Таблица 5). При распределении генетических вариантов в гене *TTN* с точки зрения различных типов мутаций большинство, ожидаемо, составили однонуклеотидные варианты (n=369, 92%), что составляет примерно 1,5 варианта на одного пациента и значительно отличается от частоты однонуклеотидных вариантов в контрольной группе (0,151, p<0,001). Анализ распределения по степени патогенности выявленных вариантов среди различных типов кардиомиопатий показал, что большая часть вариантов неопределенной значимости обнаруживалась в группе пациентов с ДКМП и НМ (52% и 54% соответственно, Таблица 6). Из 401 варианта, выявленных в гене *TTN*, 29 (7,2%) пришлось на укорачивающие варианты, к числу которых относятся нонсенс мутации (24), инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания (5). Частота таких непатогенных укорачивающих вариантов в гене *TTN* в исследуемой группе составила 11,55%, что также значительно отличается от частоты укорачивающих вариантов в контрольной группе (11,55% и 2,6%, p<0,001).

Таблица 5 – Распределение вариантов с частотой менее 0,1% для однонуклеотидных вариантов и менее 5% для укорачивающих вариантов в группе пациентов с кардиомиопатиями (n=251) по характеру изменения генотипа

Ген	Тип мутации	Кол-во вариантов
<i>RBM20</i>	Однонуклеотидные варианты	7
<i>TTN</i>	Делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания	5
<i>TTN</i>	Делеции без сдвига рамки считывания	1
<i>TTN</i>	Нонсенс варианты	24
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные варианты	369
<i>TTN</i>	Замены в сайте сплайсинга	2
Итого	–	408
Итого <i>TTN_{tv}</i>	–	29 (11,55%)
Примечание: <i>TTN_{tv}</i> – укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i> .		

Таблица 6 – Распределение «сопутствующих» однонуклеотидных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* с частотой менее 0,1% по степени патогенности с учетом типа кардиомиопатии (в скобках указан процент от общего количества вариантов)

Вариант/Группа	РКМП (n=72)	ДКМП (n=63)	НМ (n=30)	ГКМП (n=53)	АКМП (n=33)
Доброкачественные	20 (17%)	23 (27%)	15 (19%)	10 (26%)	10 (19%)
Вероятно–доброкачественные	47 (39%)	18 (21%)	22 (27%)	16 (41%)	20 (39%)
Неопределенной значимости	54 (44%)	44 (52%)	43 (54%)	13 (33%)	21 (42%)
Итого	121	85	80	39	51
Примечание: РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АКМП – аритмогенная кардиомиопатия.					

Таким образом, при проведении высокопроцессивного секвенирования нами были определены спектр и частота «сопутствующих» вариантов в генах *TTN* и *RBM20* как в контрольной группе, так и в группе пациентов с различными типами КМП, которые наряду с причинными мутациями способствуют фенотипической реализации ремоделирования миокарда. Частота встречаемости «сопутствующих» вариантов в гене *TTN* была значительно выше у пациентов с КМП по сравнению с контрольной группой (примерно в 10 раз больше для однонуклеотидных вариантов и в 3 раза для *TTNtv*). Кроме того, «сопутствующие» варианты у пациентов с ДКМП, НМ и АКМП чаще являлись вариантами неопределенной значимости и располагались в экзонах, имеющих высокий индекс PSI, что может являться дополнительным фактором эксцентрического ремоделирования миокарда и развития систолической дисфункции.

Спектр вариантов в генах *TTN* и *RBM20* у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Развитие поиска генетических ассоциаций в конце 20 века открыло возможность описания новых генетических вариантов, ассоциированных с развитием сердечной недостаточности. Среди описанных генов, вероятно обуславливающих развитие ХСНнФВ (хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса), в ряде работ был упомянут и тайтин, который может являться модификатором течения ХСН вследствие своих множественных эффектов в отношении структуры и функции саркомера. На сегодняшний день данные о частоте, функциональной характеристике и роли различных вариантов в гене *TTN* у пациентов с ХСН единичны в зарубежных источниках и полностью отсутствуют в отношении российской популяции. Для оценки влияния вариантов в гене *TTN* на развитие и прогрессирование приобретенной сердечно-сосудистой патологии, в частности, на течение постинфарктного ремоделирования миокарда, нами была обследована группа мужчин с ХСН (n=494), перенесших инфаркт миокарда (ИМ), находящихся на стандартной медикаментозной терапии. Исследуемая выборка пациентов

была разделена на подгруппы в зависимости от степени снижения фракции выброса левого желудочка. Клиника ХСН I ФК оценивалась на фоне проводимой полноразмерной терапии ХСН. Оценка анализируемых клинических параметров проводилась в период от 6 до 24 месяцев после перенесенного ИМ.

При генетическом исследовании пациентов с ХСН (n=494), в генах *TTN* и *RBM20* суммарно было найдено 40271 однонуклеотидных–вариантов, 340 из них были с частотой встречаемости менее 0,1%. Однонуклеотидные варианты с частотой более 0,1% были исключены из дальнейшего анализа клинико–генетических ассоциаций, так как с учетом размера гена *TTN*, сложности белковой структуры тайтина и высокой частоты встречаемости однонуклеотидных вариантов в данном гене, функциональный вклад таких вариантов в нарушение функции белка в настоящий момент достоверно оценить не представляется возможным. Таким образом, частота однонуклеотидных–вариантов с частотой менее 0,1% в генах *TTN* и *RBM20* в исследуемой группе составила 64% и 4,9% соответственно. При сравнении данного показателя в исследуемой группе с контрольной группой выявлено достоверное различие в частоте встречаемости однонуклеотидных вариантов с частотой менее 0,1% в генах *TTN* и *RBM20* в данных генах (Таблица 7).

Таблица 7 – Среднее количество однонуклеотидных вариантов с частотой встречаемости менее 0,1% на одного пациента в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью (n=494) и в группе контроля

Ген/Группа	ХСНсФВ (n=92)	ХСНунФВ (n=142)	ХСНнФВ (n=260)	ХСН (n=494)	Контроль (n=192)	p–value (ХСН / Контроль)
<i>RBM20</i>	6 (0,065)	5 (0,035)	13 (0,05)	24 (0,049)	2 (0,01)	<0,05
<i>TTN</i>	50 (0,54)	103 (0,725)	163 (0,627)	316 (0,64)	29 (0,151)	<0,05
Доля пациентов с 1 и более однонуклеотидных вариантом, (n)	43,5% (40)	55,6% (79)	51,5% (134)	51,2% (253)	13,5% (26)	<0,05
Примечание: ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНунФВ – хроническая сердечная недостаточность с умеренно низкой фракцией выброса, ХСНсФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса.						

Также при проведении генетического исследования в группе пациентов с ХСН были обнаружены делеции и инсерции без сдвига рамки считывания, варианты в сплайс сайтах и укорачивающие варианты, при дальнейшем анализе учитывались только варианты с частотой менее 5%, среди которых было 32 варианта NF ins/del, 81 вариант в сайтах сплайсинга и 8 *TTN*tv, большинство из которых составляли нонсенс варианты. Нами было проведено сравнение частот данных вариантов в группе пациентов с ХСН и в контрольной группе, а также между различными подгруппами пациентов с ХСН (Таблица 8). Кроме того, была создана подгруппа, объединяющая пациентов с ХСНсФВ и ХСНунФВ, для сравнения пациентов без существенного снижения ФВ с пациентами ХСНнФВ.

Таблица 8 – Сравнение частот укорачивающих вариантов в гене *TTN*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерции и делеции без сдвига рамки считывания генетических вариантов в подгруппах пациентов с хронической сердечной недостаточностью (n=494) с контрольной группой (n=192) с частотой встречаемости менее 5%

Вариант/Группа	ХСНсФВ (n=92)	ХСНунФВ (n=142)	ХСНс+унФВ (n=234)	ХСНнФВ (n=260)	ХСН (n=494)	Контроль (n=192)
<i>TTNtv</i>	1,0% (1)	0% (0)	0,4% (1)	2,7% (7)	1,6% (8)	2,6% (5)
p<0,05						
Splice	15% (14)	13% (19)	14% (33)	18% (48)	16% (81)	9,9% (19)
p<0,05						
NF ins/del	11,8% (11)	9,2% (13)	10% (24)	6,9% (18)	8,5% (42)	2,6% (5)
p<0,05						
<i>TTNtv</i> +NF ins/del	13% (12)	9,2% (13)	10,7% (25)	9,6% (25)	10,1% (50)	5,2% (10)
<i>TTNtv</i> +Splice	16% (15)	13% (19)	14,5% (34)	21% (55)	16% (89)	12,5% (24)
p<0,05 p<0,05						
<i>TTNtv</i> +NF ins/del+Splice	28% (26)	23% (32)	25% (58)	28% (73)	26,5% (131)	15,1% (29)
p<0,05						
Примечание: ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНунФВ – хроническая сердечная недостаточность с умеренно низкой фракцией выброса, ХСНсФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса, Splice – варианты в сайтах сплайсинга, NF ins/del – инсерции и делеции без сдвига рамки считывания.						

При сравнении частоты *TTNtv* с использованием одностороннего критерия Фишера было выявлено достоверное различие между группой пациентов с ХСНнФВ и пациентами, страдающими ХСН, без существенного снижения ФВ (ХСНсФВ+ХСНунФВ) (2,7% и 0,4%, $p < 0,05$). При сравнении частоты встречаемости вариантов в сайтах сплайсинга с использованием двустороннего критерия Фишера было выявлено достоверное различие между группой пациентов с ХСНнФВ и контрольной группой (18% и 9,9%, $p < 0,05$). При сравнении совместной частоты *TTNtv* и вариантов в сайтах сплайсинга с использованием одностороннего критерия Фишера было выявлено достоверное различие между группой пациентов с ХСНнФВ и пациентами, страдающими ХСН, без существенного снижения ФВ (ХСНсФВ+ХСНунФВ), а также по сравнению с контрольной группой (21%, 14,5% и 12,5% соответственно, $p < 0,05$). Таким образом, нами была выявлена ассоциация низкой ФВ при ХСН с наличием укорачивающих форм в гене *TTN* (*TTNtv*), связь развития ХСН с наличием вариантов в сайтах сплайсинга, а также инсерций и делеций без сдвига рамки считывания. Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что данные варианты могут являться прогностическими факторами развития ХСН или ее более тяжелого течения, ассоциированного с развитием дилатационного фенотипа ремоделирования.

На последнем этапе была произведена оценка уровня PSI различных типов генетических вариантов у пациентов исследуемых подгрупп и сравнение данных показателей с данными в контрольной группе и выявлена достоверная разница в значении PSI *TTNtv* между подгруппами ХСН и группой контроля ($64,1 \pm 49,5\%$ и $52,2 \pm 48,3\%$, $p < 0,05$). Таким образом, в группе пациентов с ХСН чаще определяются *TTNtv* и однонуклеотидных–варианты с высоким значением PSI, в то время как для контрольной группы характерны низкие значения PSI для однонуклеотидных–вариантов и высокие для вариантов в сайтах сплайсинга.

Анализ взаимосвязи укорачивающих вариантов в гене *TTN* с частотой минорного аллеля менее 5% и полиморфных вариантов в гене *RBM20* с наличием фибрилляции предсердий в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью

При проведении сравнения внутри всей группы пациентов с ХСН, а также отдельных подгрупп на предмет возможного наличия ассоциации между *TTNtv* и вариантами в сайтах сплайсинга, морфо–функциональными параметрами ЛП и наличием ФП достоверных различий в размерах ЛП, наличия ФП и уровне ФВ выявлено не было, хотя в большинстве случаев наблюдаются большие размеры ЛП у пациентов с *TTNtv* и вариантами в сайтах сплайсинга, что требует исследования большего количества пациентов с данной патологией.

На следующем этапе работы нами была проведена оценка возможной связи полиморфных вариантов гена *RBM20* (rs942077 и rs35141404) со структурно–функциональным ремоделированием миокарда у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, а также наличием ФП (Таблица 9).

Таблица 9 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в подгруппах пациентов с хронической сердечной недостаточностью и в контрольной группе

Полиморфизм/Группа		ХСНнФВ (n=260)	ХСНс+унФВ (n=234)	ХСН (n=494)	Контрольная группа (n=192)	GnomAd/RUSeq/ BioBank Russia
rs942077	C	91,2% (474)	95,1% (445)	93% (919)	88,5% (340)	86,7%/89,4%/89%
	G	8,8% (46)	4,9% (23) $P_{1,2}<0,05$	7% (69)	11,5% (44) $P_{3,4}<0,05$	13,3%/10,6%/11%
rs35141404	G	82,3% (428)	85% (398)	84,2% (832)	90% (345)	85,1%/88,4%/88%
	A	17,7% (92)	15% (70)	15,8% (156)	10% (37)	14,9%/11,6%/12%
—		$p<0,05$				—
Примечание: ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНс+унФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса.						

Было выявлено достоверное различие между частотой минорного аллеля G rs942077 между двумя подгруппами ХСН (8,8% и 4,9%), а также между группой ХСН и контрольной группой (7% и 11,5%), при этом минорный аллель G rs942077 достоверно чаще встречался именно в контрольной группе. Минорный аллель A rs35141404 достоверно чаще встречался у пациентов с ХСН как с ФВ ЛЖ менее 40%, так и у группы пациентов ФВ ЛЖ > 40% по сравнению с контрольной группой. Таким образом, нами была показана ассоциация аллеля G rs942077 и аллеля A rs35141404 с развитием ХСН в популяции жителей Санкт-Петербурга. Различия в распространенности минорных аллелей данных вариантов в зависимости от наличия ФП у пациентов с ХСНнФВ отсутствовали.

Исходя из вышеизложенных результатов, можно сделать вывод об отсутствии влияния укорачивающих вариантов в гене *TTN* на развитие ФП у пациентов с ХСН, схожая ситуация наблюдается и с полиморфными вариантами в гене *RBM20* (rs942077 и rs35141404). В отношении влияния вышеуказанных полиморфных вариантов в гене *RBM20* наблюдается схожая картина с *TTNtv*: минорные аллели данных вариантов также ассоциированы с развитием ХСН и формированием низкой ФВ. Полученные результаты свидетельствуют о взаимосвязи *TTNtv* и полиморфных вариантов в гене *RBM20* с развитием и течением ХСН, то есть с формированием систолической дисфункции и эксцентрического ремоделирования миокарда, и отсутствием значимого эффекта в отношении формирования нарушений сердечного ритма (фибрилляции предсердий).

Влияние укорачивающих вариантов в гене *TTN* и полиморфных вариантов в гене *RBM20* на риск развития хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса

На следующем этапе нами была проведена оценка рисков встречаемости ХСНнФВ у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и наличием *TTNtv* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга, а также выявленными нами на предыдущем этапе аллелями в гене *RBM20*, ассоциированными с развитием ХСН (rs942077 аллель С и rs35141404 аллель А). Нами было показано, что в группе пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и ХСН наличие *TTNtv* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга повышает риск встречаемости ХСНнФВ в 1,24 раза (Таблица 10) а сочетание *TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга и аллеля С rs942077 в 1,31 раза.

Таблица 10 – Относительный риск развития хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса в группе пациентов с хронической сердечной недостаточности при наличии укорачивающих вариантов в гене *TTN* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга *TTN* и *TTNtv* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга *TTN* и полиморфными вариантами в гене *RBM20*

Группа/Варианты	Есть <i>TTNtv</i> +splice	Нет <i>TTNtv</i> +splice
ХСНнФВ	41	219
ХСНс+унФВ	23	211
ОР- 1,24 (95% ДИ = 1,024-1,454)		
–	Есть <i>TTNtv</i> +splice +rs942077(аллель С)	Нет <i>TTNtv</i> +splice +rs942077(аллель С)
ХСНнФВ	38	222
ХСНс+унФВ	19	215
ОР- 1,31 (95% ДИ = 1,069-1,612)		
–	Есть <i>TTNtv</i>	Нет <i>TTNtv</i>
ХСН с ФВ ≤ 35%	7	229
ХСН с ФВ > 35%	1	257
ОР- 1,86 (95% ДИ = 1,406-2,453)		
Примечание: <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i> , splice – варианты в сайтах сплайсинга, ФВ – фракция выброса, ОР – отношение рисков, ДИ – доверительный интервал, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНс+унФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса.		

Надо отметить, что укорачивающие варианты тайтина встречались в когорте пациентов с ХСНнФВ, имеющих ФВ ЛЖ ≤ 35% (n=236) и составила 2,9% по сравнению с пациентами с ПИКС и ФВ > 35% (n=258). Риск встретить пациента с ХСНнФВ и ФВ ЛЖ ≤ 35% в когорте больных с постинфарктным кардиосклерозом и ХСН, имеющих *TTNtv*, увеличивается в два раза (отношение рисков – 1,86 (95% доверительный интервал =1,406-2,453), (Рисунок 2).

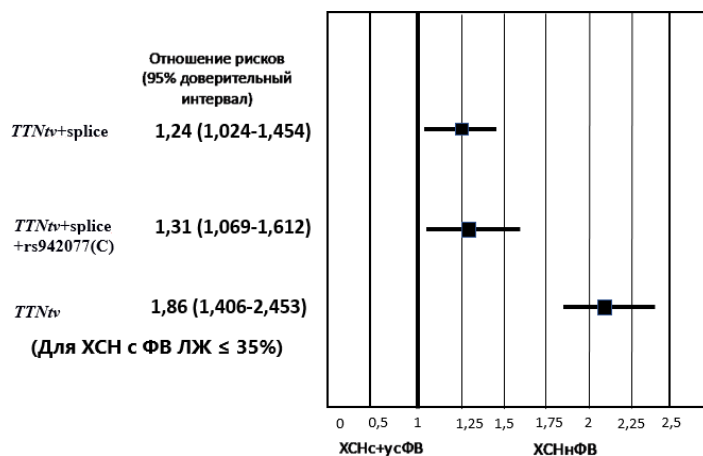


Рисунок 2 – Риск развития хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия вариантов в генах *TTN* и *RBM20*

Примечание: *TTNtv* – укорачивающие варианты в гене *TTN*, splice – варианты в сайтах сплайсинга, ХСН – хроническая сердечная недостаточность, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНс+унФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса.

Таким образом нами еще раз продемонстрировано, что наличие укорачивающих вариантов в гене *TTN* и их сочетание с вариантами в гене *RBM20* может иметь прямую связь с вероятностью развития ХСНнФВ в группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда.

Сравнение распределения выявленных генетических вариантов в доменной структуре тайтина

Ранее в работе ряда авторов было показано, что *TTNtv* имеют разную степень патогенности в зависимости от локализации в структуре гена, в частности варианты, расположенные в А-зоне молекулы тайтина являются наиболее пенетрантными (Akinrinade O.,2015, Herman D.,2012). После того как выявления всех вариантов в контрольной и исследуемой группах, была проведена оценка их пенетрантности с учетом таких критериев как уровень PSI и локализация в доменной структуре тайтина. На первом этапе было проведено распределение выявленных укорачивающих по доменной структуре тайтина (Таблица 11). Статистически значимого различия между контрольной и исследуемыми группами выявить не удалось вследствие малого количества укорачивающих вариантов. При этом полученные результаты демонстрируют определенную тенденцию: в частности, наблюдается относительно высокая доля вариантов в I-зоне у пациентов контрольной группы (60%) по сравнению с группами пациентов с ХСНнФВ и больными КМП (43% и 51,7% соответственно), экзоны в которой зачастую имеют низкий уровень PSI. Кроме того, аналогичная картина наблюдается в отношении *TTNtv*, локализованных в А-зоне: относительно низкая доля в контрольной группе (20%) по сравнению с аналогичным показателем в группах пациентов с ХСНнФВ и больными КМП (57% и 41,5% соответственно).

Таблица 11 – Распределение укорачивающих вариантов по структуре транскрипта гена *TTN*

Область/Группа	Контрольная группа (n=192)	Группа ХСНс+унФВ (n=234)	Группа ХСНнФВ (n=260)	Группа КМП (сопутствующие варианты) (n=251)
Z-диск	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,4%)
I-зона	3 (60%)	1 (100%)	3 (43%)	15 (51,7%)
A-зона	1 (20%)	0 (0%)	4 (57%)	12 (41,5%)
M-линия	1 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,4%)
Итого	5 (100%)	1 (100%)	7 (100%)	29 (100%)

Примечание: ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНс+унФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса, КМП - кардиомиопатии.

На следующем этапе было произведено сравнение PSI экзонов, содержащих различные типы генетических вариантов (Таблица 12). Было выявлено достоверное различие в уровне PSI экзонов, содержащих *TTNtv* и варианты в сайтах сплайсинга, между группой пациентов с ХСНнФВ и контрольной группой. В отношении вышеуказанных показателей также наблюдалось достоверное различие между группой пациентов с КМП и контрольной группой.

Таблица 12 – Уровень PSI экзонов, содержащих варианты у пациентов контрольной и исследуемой групп.

Вариант/Группа	Контрольная группа (n=192)	ХСНс+унФВ (n=234)	ХСНнФВ (n=260)	Группа КМП (сопутствующие варианты) (n=251)
Однонуклеотидные варианты, (n)	67,7±41,8% (29)	80,8±35,1% (153)	66,8±32,3% (163)	77,75±34,1% (369)
<i>TTNtv</i> , (n)	52,2±48,3% (5)	5±0%(1)	72,6±46,8% (7) $p_{1,3}<0,05$	77,4±38,1% (29) $p_{1,4}<0,05$
Варианты в сайтах сплайсинга, (n)	99,5±1,4% (8)	79,5±38,2% (33)	59,4±39,8% (48) $p_{1,3}<0,05$	52±67,9% (2) $p_{1,4}<0,05$
Инсерции и делеции без сдвига рамки считывания, (n)	40,6±54,2% (5)	16,5±33,6% (24)	37,7±47,5% (18)	48±0%(1)

Примечание: ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ХСНс+унФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса, КМП - кардиомиопатии.

На заключительном этапе было произведено сравнение распределения *TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеции без сдвига рамки считывания по структуре гена *TTN* у пациентов всех исследуемых групп. Стоит отметить, что у пациентов с ХСНс+унФВ значительная часть вариантов располагается в области с редкоэкспрессирующимися экзонами также, как и значительная часть *TTNtv* в контрольной группе. В то же время у пациентов с КМП варианты в данной области практически отсутствуют.

Таким образом, с учетом полученных данных можно сделать вывод о неодинаковом распределении генетических вариантов по доменной структуре тайтина у пациентов различных групп, что подтверждает влияние сопутствующих вариантов в данном гене на развитие сердечно-сосудистой патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установленная нами частота *TTNtv* в контрольной группе сопоставима с данными большинства зарубежных исследований (Ware J., 2018).

В отношении укорачивающих вариантов обращает на себя внимание существенная разница в среднем уровне PSI для экзонов с *TTNtv* и вариантов в сайтах сплайсинга (52,2% и 99,5% соответственно), что косвенно указывает на меньшую степень патогенности и/или функциональной значимости сплайсинговых вариантов. Так, в нашем исследовании в группе пациентов с ХСН, где варианты в сайте сплайсинга не были ассоциированы с плохим прогнозом, а наоборот – чаще встречаются в группе пациентов с лучшими показателями ремоделирования миокарда. В связи с этим полученные в нашем исследовании данные относительно вариантов в сплайсинговых сайтах гена *TTN* являются абсолютно новыми и диктуют необходимость дальнейшей более детальной оценки роли вариантов в сайтах сплайсинга *TTN* в ремоделировании миокарда в ответ на нагрузку и повреждение.

Помимо гена *TTN* в нашей работе была проведена оценка частот вариантов в гене *RBM20*, в результате чего мы показали, что частота минорных аллелей для большинства вариантов в этом гене также совпадает с данными международных баз данных и публикаций (Dai J., 2021). С учетом важности данного гена для сплайсинга не только тайтина, но и множества других генов саркомера и ионных каналов (Guo W., 2018), полученные данные являются крайне актуальными для анализа последующих генотип-фенотипических взаимодействий у пациентов с различными врожденными и приобретенными заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

В исследованной нами группе обращает внимание относительно высокая доля вариантов неопределенной значимости у пациентов с ДКМП и НМЛЖ (49,2% и 54,3% соответственно) по сравнению с больными другими типами КМП. Так как за вариантами неопределенной значимости зачастую скрываются потенциально патогенные варианты либо варианты, выступающие в качестве модификаторов клинической картины, большой уровень представленности таких «сопутствующих» вариантов именно у данных пациентов представляется ожидаемым. В то же время более низкий уровень вариантов неопределенной значимости (33,3%) у пациентов с ГКМП, по сравнению с группами ДКМП и НМЛЖ может объясняться меньшим вкладом данных генов в патогенез ГКМП. Схожая картина наблюдается и в отношении уровня PSI экзонов, в которых детектировались данные варианты: наиболее высокие значения отмечаются у пациентов с НМЛЖ (54,07%), ДКМП (58,33%) и АКМП (62,13%) в сравнении с ГКМП и РКМП.

В нашей работе мы показали, что среди пациентов с ХСН (n=494) частота встречаемости однонуклеотидных вариантов примерно в 4 раза превышает аналогичный показатель в контрольной группе (64% и 15,1%). На сегодняшний день мы не можем достоверно оценить вклад единичных нуклеотидных замен и однонуклеотидных вариантов в *TTN* в развитие дисфункции миокарда и ХСН, но возможно совокупность однонуклеотидных вариантов и их комбинация с *TTNtv* может являться важным фактором ремоделирования миокарда в ответ на различные рода стрессовые воздействия и неблагоприятные внешние факторы, в частности, ишемического повреждение.

В нашем исследовании мы не получили достоверную ассоциацию между наличием *TTNtv* и риском развития фибрилляции, что может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, общее количество *TTNtv* в группе с ХСН было незначительным (8), что не позволило провести полноценный статистический анализ. Во-вторых, возраст пациентов ($57,4 \pm 7,4$ года), а также наличие большого количества коморбидных факторов и сопутствующей патологии (артериальная гипертензия, сахарный диабет 2 типа, ожирение) в исследуемой группе пациентов могли оказывать значительно большее влияние на развитие наджелудочковых нарушений ритма, нежели собственно формы *TTN*.

Нами впервые была продемонстрирована ассоциация *TTNtv* с развитием ХСНнФВ, а также показано преимущественная локализация выявленных при ХСНнФВ вариантов *TTNtv* в области А-зоны тайтина. Отсутствие выявленной связи между укорачивающими вариантами в *TTN* и развитием фибрилляции предсердий, ранее продемонстрированное в нескольких исследованиях, обусловлено, вероятно, наличием в исследуемой группе других влияющих на развития наджелудочковых нарушений ритма факторов, таких как ожирение, сахарный диабет и артериальная гипертензия, более старшим возрастом пациентов на момент исследования, а также сроками наблюдения.

На основе полученных в ходе данной работы результатов нами был сделан вывод об отсутствии влияния укорачивающих вариантов в гене *TTN* на развитие ФП у пациентов с ХСН, как и полиморфных вариантов гена *RBM20* (rs942077 и rs35141404). Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о наличии влияния *TTNtv* и полиморфных вариантов в гене *RBM20* на развитие и течение ХСН, то есть на формирование систолической дисфункции и эксцентрического ремоделирования миокарда, но при этом отсутствии влияния *TTNtv* на формирование нарушений сердечного ритма.

ВЫВОДЫ

1. Среди кардиомиопатий, ассоциированных с вариантами в гене *TTN*, преобладают формы с дилатационным фенотипом (дилатационная кардиомиопатия и некомпактный миокард левого желудочка), развившиеся на фоне укорачивающих вариантов тайтина; для мутаций в гене *RBM20* характерно развитие тяжелого дилатационного фенотипа кардиомиопатии с дебютом заболевания в детском возрасте.
2. У пациентов с различными формами кардиомиопатий частота редких (менее 0,1%) вариантов в гене *TTN* выше по сравнению с общей популяцией жителей Санкт-Петербурга. Для кардиомиопатий с дилатационным фенотипом характерны более высокая доля редких вариантов неопределенной значимости в гене *TTN*, вариантов в экзонах с высоким значением индекса сплайсинга, а также вариантов, нарушающих структурные характеристики белка.

3. Частота редких (менее 0,1%) точечных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* и укорачивающих вариантов в гене *TTN* в популяции жителей Санкт-Петербурга значимо не отличается от значений, представленных в международных базах данных и составляет, соответственно 15,1%, 1% и 2,6%.
4. У пациентов с постинфарктным кардиосклерозом развитие хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса ассоциировано с наличием укорачивающих форм в гене *TTN*, а также сочетанием укорачивающих форм в гене *TTN* и вариантов в сайтах сплайсинга; наличие укорачивающих форм в гене *TTN* повышает риск встречаемости хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса с фракцией выброса левого желудочка $\leq 35\%$ в 1,86 раз.
5. У пациентов в течение 6-24 месяцев после перенесенного инфаркта миокарда не наблюдается достоверной ассоциации между укорачивающими формами в гене *TTN*, вариантами в сайтах сплайсинга *TTN*, а также аллелями вариантов rs35141404 и rs942077 с параметрами левого предсердия и наличием их фибрилляции.
6. В группах пациентов с кардиомиопатиями и постинфарктным кардиосклерозом с хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса наблюдается преимущественная локализация укорачивающих вариантов в гене *TTN* в экзонах с высоким показателем процента сплайсинга по сравнению с пациентами контрольной группы, а также локализация данных вариантов в области А-зоны молекулы тайтина.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные в ходе выполнения работы данные о частоте и спектре генетических вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в условно-здоровой группе жителей Санкт-Петербурга могут быть рекомендованы в качестве референсных значений для анализа патогенности и причинной значимости выявляемых генетических вариантов при различных формах кардиомиопатий, нарушений ритма и других заболеваниях сердечно-сосудистой системы.
2. Пациентам с перенесенным инфарктом миокарда рекомендовано учитывать наличие сопутствующих укорачивающих вариантов в гене *TTN* для определения прогноза заболевания и стратификации групп рисков.
3. Пациентам с идиопатическими формами кардиомиопатий показано проведение генетического обследования, включающего полноразмерное секвенирование всего гена *TTN* для установления этиологической причины заболевания, анализа типа патогенного варианта и последующего каскадного скрининга членов семьи пробанда.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Диссертационное исследование заложило основу для создания базы данных генетических вариантов в генах *TTN* и *RBM20* как в условно-здоровой российской популяции, так и среди пациентов с различными заболеваниями сердечно-сосудистой системы. С учетом развития технологии индуцированных плюрипотентных клеток и CRISPR-Cas9 результаты исследования дают возможность дальнейшей функциональной оценки выявленных вариантов в контексте их влияния на структуру и функцию кардиомиоцитов. С учетом полученных знаний возможным вариантом лечения пациентов с патогенными вариантами в гене *RBM20* может являться создание

генотерапевтических препаратов для восстановления функции гена. Создание антисмысловых олигонуклеотидов для удаления экзона из матричной РНК может являться актуальным подходом для лечения патологий, ассоциированных с вариантами в других генах, кодирующих крупные белки саркомера, такие как небулин или филамин. Создание и внедрение подобных индивидуальных препаратов позволит значительно улучшить качество жизни пациентов с кардиомиопатиями.

Список основных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Улитин А.М. Генетические детерминанты, ассоциированные с развитием и прогнозом постинфарктного ремоделирования и хронической сердечной недостаточности / А. М. Улитин, В. М. Тишкова, А. А. Куулар [et al.] // Трансляционная медицина. – 2018. – Т. 5. – №1. – С.70.
2. Мельник О.В. Филаминовая рестриктивная кардиомиопатия: о чём следует знать / О. В. Мельник, А. А. Князева, О. Ю. Полубояринова [et al.] // Трансляционная медицина. – 2018 – Т. 5. – №3. – С. 15-22.
3. Киселёв А. М. Варианты в гене *RBM20* у пациентов детского возраста с дилатационной кардиомиопатией / А. М. Киселёв, Т. Л. Вершинина, С. И. Тарновская [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2019. – Т. 24. – №10. – С. 70.
4. Вахрушев Ю. А. Некомпактный миокард левого желудочка, ассоциированный с укорачивающими вариантами в гене *TTN* (*TTN*) / Ю. А. Вахрушев, Т. Л. Вершинина, П. А. Федотов [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Т. 25. – №10. – С. 63-69.
5. Vakhrushev Y. *RBM20*–Associated Ventricular Arrhythmias in a Patient with Structurally Normal Heart / Y. Vakhrushev, A. Kozyreva, A. Semenov [et al.] // Genes. – 2021. –Т. 12. –№1. – С. 1-6.
6. Вахрушев Ю. А. Анализ частоты и спектра вариантов в гене *TTN* в условно здоровой российской популяции / Ю.А. Вахрушев, А.А. Козырева, С.В. Жук [et al.] // Трансляционная медицина. – 2021. – Т. 8. – №5. – С. 29–37.
7. Вахрушев Ю. А. Варианты гена *RBM20*, ассоциированные с дилатацией левого предсердия у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и сердечной недостаточностью с низкой фракцией выброса / Ю.А. Вахрушев, А.А. Куулар, В.К. Лебедева [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Т. 26. – № 10. – С. 9–15.
8. Вахрушев Ю. А. Спектр непатогенных вариантов в гене *TTN* и генах внутри- и внесаркомерного цитоскелета (*TTN*, *MYBPC3*, *FLNC*, *RBM20*) у пациентов с различными вариантами кардиомиопатий / Ю.А. Вахрушев, А.С. Муравьев, А.А. Козырева [et al.] // Трансляционная медицина. – 2022. –Т. 9. – №2. – С. 37–49.
9. Андреева С.Е. Молекулярные основы амилоидного поражения миокарда: не только *ATTR* и *AL*. Клинический случай / С.Е. Андреева, П.П. Снетков, Ю.А. Вахрушев [et al.] // Трансляционная медицина. – 2022. – Т. 9. – №6. – С. 26-35.
10. Вахрушев Ю. А. Особенности клинического течения кардиомиопатий на фоне укорачивающих вариантов в гене *TTN*: обзор литературы и анализ клинических случаев / Ю.А. Вахрушев, С.Е. Андреева, А.Я. Гудкова [et al.] // Трансляционная медицина. – 2023. – Т.10. – №5. – С. 430-438.