

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный федеральный медицинский исследовательский центр
им. В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Костарева Анна Александровна
доктор медицинских наук

Санкт–Петербург

2024 год

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Тайтин как структурная единица саркомера.....	15
1.2 Тайтин и механотрансдукция	17
1.2.1 Влияние изоформ тайтина на жесткость и растяжимость саркомера	18
1.2.2 Регуляция жесткости молекулы тайтина посредством фосфорилирования. 23	
1.2.3 Посттрансляционные модификации тайтина, связанные с кислородным голоданием.....	26
1.3 Тайтин и структурные особенности миокарда. Варианты гена тайтина в контрольной группе, укорачивающие варианты гена <i>TTN</i>	28
1.4 Генетические варианты тайтина и врожденные заболевания миокарда.....	30
1.5 Тайтин и приобретенные патологии миокарда	41
1.5.1 Кардиомиопатии, индуцированные химиотерапией.....	41
1.5.2 Алкогольные кардиомиопатии	43
1.5.3 Перипартальная кардиомиопатия	44
1.6 Актуальность исследования укорачивающих вариантов гена <i>TTN</i> у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, обусловленной приобретенными заболеваниями миокарда	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	50
2.1 Материал исследования.....	50
2.2 Инструментально–лабораторные методы исследования	52
2.2.1. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты	52
2.2.2 Секвенирование по Сэнгеру	53
2.2.3 Ультразвуковая обработка дезоксирибонуклеиновой кислоты.....	54
2.2.4 Подготовка библиотек для секвенирования нового поколения.....	55
2.2.5 Секвенирование нового поколения.....	58
2.3 Методы статистической обработки результатов	59

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	61
3.1 Распределение вариантов в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> в группе жителей Санкт-Петербурга	61
3.1.1. Распределение вариантов в доменной структуре тайтина в группе жителей Санкт-Петербурга	68
3.2 Спектр вариантов в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> среди пациентов с различными типами кардиомиопатий	70
3.2.1 Варианты в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> в группе пациентов с различными типами кардиомиопатий	71
3.2.2 Клинические примеры кардиомиопатий с дилатационным фенотипом, обусловленных вариантами в гене <i>TTN</i>	78
3.2.3 Клинические примеры некомпактного левого желудочка, обусловленного вариантами в гене <i>TTN</i>	82
3.2.4 Клинические примеры кардиомиопатий со смешанным фенотипом или трансформацией фенотипов, обусловленные вариантами в гене <i>TTN</i>	84
3.2.5 Клинический пример кардиомиопатий с аритмогенным фенотипом, ассоциированный с вариантом в гене <i>RBM20</i>	92
3.2.6 Особенности клинической картины кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> у пациентов детского возраста.	95
3.2.7 Спектр непатогенных вариантов в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> у пациентов с кардиомиопатиями и причинными вариантами в других генах	109
3.2.8. Распределение укорачивающих вариантов по доменной структуре тайтина у пациентов с кардиомиопатиями	114
3.3 Спектр вариантов в генах <i>TTN</i> и <i>RBM20</i> у пациентов с хронической сердечной недостаточностью	115
3.3.1 Распределение патогенных вариантов по доменной структуре тайтина у пациентов с хронической сердечной недостаточностью	136
3.3.2 Влияние укорачивающих вариантов в гене <i>TTN</i> и полиморфных вариантов в гене <i>RBM20</i> на вероятность развития хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса	137

3.4 Сравнение распределения выявленных генетических вариантов в доменной структуре тайтина	140
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	144
ВЫВОДЫ	161
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	163
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	164
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	165
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	167
ПРИЛОЖЕНИЕ	190
Приложение 1. Список исследованных генов и их локализация у пациентов с кардиомиопатиями.....	190

ВВЕДЕНИЕ

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 последних – ген тайтина (*TTN*) - белка, придающего саркомеру пассивную жесткость, а также выполняющего ряд других функций [135].

Мутации в гене *TTN*, кодирующем белок тайтин, приводят к снижению устойчивости структуры и неправильному формированию саркомера, а также аномальной сборке миофибрилл. Из-за широкого спектра функций тайтина и его присутствия как в кардиомиоцитах, так и в поперечно-полосатых мышечных клетках, мутации в гене *TTN* приводят к различным заболеваниям миокарда и скелетной мускулатуры, таким как гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) и аритмогенная кардиомиопатия (АКМП), а также различные миопатии и миодистрофии. После описания ассоциации мутаций в тайтине 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. Несмотря на то, что вклад отдельных вариантов в гене *TTN* на развитие некоторых заболеваний доказано, для большинства вариантов до сих пор механизмы развития патогенетического эффекта остаются неизученными. В частности, было обнаружено, что сила упругости тайтина сильно варьируется в здоровом и патологически измененном миокарде, что

определяется множеством молекулярных механизмов, таких как фосфорилирование или альтернативный сплайсинг. 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. Ген *RBM20*, кодирующий одноименный белок изначально был идентифицирован в 2009 году, как один из генов, связанных с развитием ДКМП [27]. Ранее считалось, что мутации в гене *RBM20* приводят только к развитию ДКМП, однако на сегодняшний день также доказана связь вариантов в данном гене с развитием некомпактного миокарда левого желудочка (НМЛЖ) [173]. 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 данной молекулой. Стоит заметить, что примерно у 1–3% людей в популяции имеются укорачивающие варианты гена *TTN* (*TTNtv*) (то есть варианты, изменяющие длину белка тайтина) в гетерозиготном состоянии [192]. На фоне благоприятных условий внешней среды они могут фенотипически не проявляться, однако, по данным некоторых авторов, 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 [71].

Для полномасштабного исследования эффектов полиморфизмов и патогенных и вероятно патогенных вариантов в гене *TTN* существуют объективные сложности, связанные с детекцией и интерпретацией данных молекулярно–генетического анализа. Из–за большого размера гена целесообразно использовать высокопроцессивное секвенирование, однако данный метод является дорогостоящим, требует высокой квалификации персонала и ограничено доступен. На сегодняшний день существует очень ограниченное количество исследований генотип–фенотипических связей, позволяющих установить четкие корреляции между вариантами в гене *TTN* и их ассоциированными фенотипами. Кроме того,

функциональная проверка мутаций гена *TTN* представляет собой сложность из-за размеров гена, огромного количества новых и индивидуальных вариантов и их диффузного распространения в структуре гена. Так, из-за большого размера гена *TTN* фактически каждый человек может нести по крайней мере одну мутацию в данном гене, включая не только однонуклеотидные варианты, но и *TTNtv*, что крайне затрудняет клиническую интерпретацию новых генетических вариантов.

С учетом опубликованных исследований на сегодня известно, что варианты в гене *TTN* могут вызывать развитие врожденной и генетически-обусловленной патологии миокарда, а также влиять на процессы ремоделирования миокарда при воздействии неблагоприятных условий, например, в процессе постинфарктного ремоделирования миокарда. В рамках данной работы изучалась связь 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*. Полученные данные были сопоставлены с данными, полученными на контрольной выборке пациентов (192 человека), что также позволило определить спектр и характер вариантов в гене *TTN* в данной группе. Поскольку ранее подобных отечественных работ не проводилось, сопоставления частот различных вариантов в гене *TTN* с данными международных баз данных приобретает особую актуальность. В качестве референсных генетических данных и источников клинической информации о фенотипах в работе были использованы международные и отечественные базы данных – GnomAd, RUSeq (<http://ruseq.ru/>), BioBank Russia (<https://biobankrus.almazovcentre.ru/>). В качестве основной референсной базы для сравнения частот в работе использовалась база данных GnomAd (<https://gnomad.broadinstitute.org>).

В результате выполненной работы были получены новые данные о частоте и характере вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в группе жителей Санкт-Петербурга,

охарактеризован спектр вариантов в гене *TTN* и гене *RBM20*, участвующем в критических процессах сплайсинга тайтина, 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 генах *TTN* и *RBM20* в течении 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**tv* 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 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 персонализированного 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 [163]. 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 [9, 161].

Критерием включения в группу пациентов с хронической сердечной недостаточностью являлось наличие у пациента соответствующей патологии в соответствии с рекомендациями Российского кардиологического общества [10], 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 отличается. 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 клиничко-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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Тайтин как структурная единица саркомера

Саркомер является наименьшей сократительной единицей поперечно-полосатых мышечных клеток, основу которого составляют три системы филаментов: толстая нить на основе миозина; тонкая нить на основе актина, дополненная регуляторным белком тропомиозином и тропониновым комплексом; и тайтиновый комплекс [96] (Рисунок 1). Тайтин является крупнейшим белком в человеческом организме, состоящим из 27,000 – 30,000 аминокислотных остатков [50] и обладающим молекулярной массой порядка 3,700 кДа [28]. Ген *TTN*, кодирующий данный белок, располагается в локусе 2q31 и обладает размером в 294 тысячи пар оснований, состоит из 363 экзонов и кодирует 38,138 аминокислотных остатков с потенциальной молекулярной массой 4,2 кДа [20].

Структурный состав тайтина в основном характеризуется последовательным расположением иммуноглобулинподобных доменов (Ig-домены), доменов фибронектина тип III и нескольких так называемых уникальных последовательностей [20]. NH₂-терминальный конец тайтина закреплен в саркомерном Z-диске через небулин или его сердечную изоформу [139], α-актинин 2 [106] и телетонин [62, 109, 134]. В части I-зоны тайтин состоит из серии проксимальных Ig-доменов, специфичного для сердца N2B-домена (включая уникальную последовательность N2B, N2-Bus), области среднего Ig-домена (не в изоформе N2B), домена PEVK (преобладающие аминокислоты: пролин (P), глутаминовая кислота (E), валин (V) и лизин (K)) и дистальных Ig-доменов. Эта часть I-зоны может быть последовательно расширена во время растяжения саркомера и представляет собой основной эластический сегмент тайтина [114, 121]. При размере около 2 МДа A-зона тайтина является самой большой частью молекулы [20], она тесно связана с миозином и миозин-связывающим белком C [109, 186]. M-

линия тайтина характеризуется несколькими вставленными последовательностями и тайтинокиназным доменом на периферии М–линии (Рисунок 1) [17, 54].

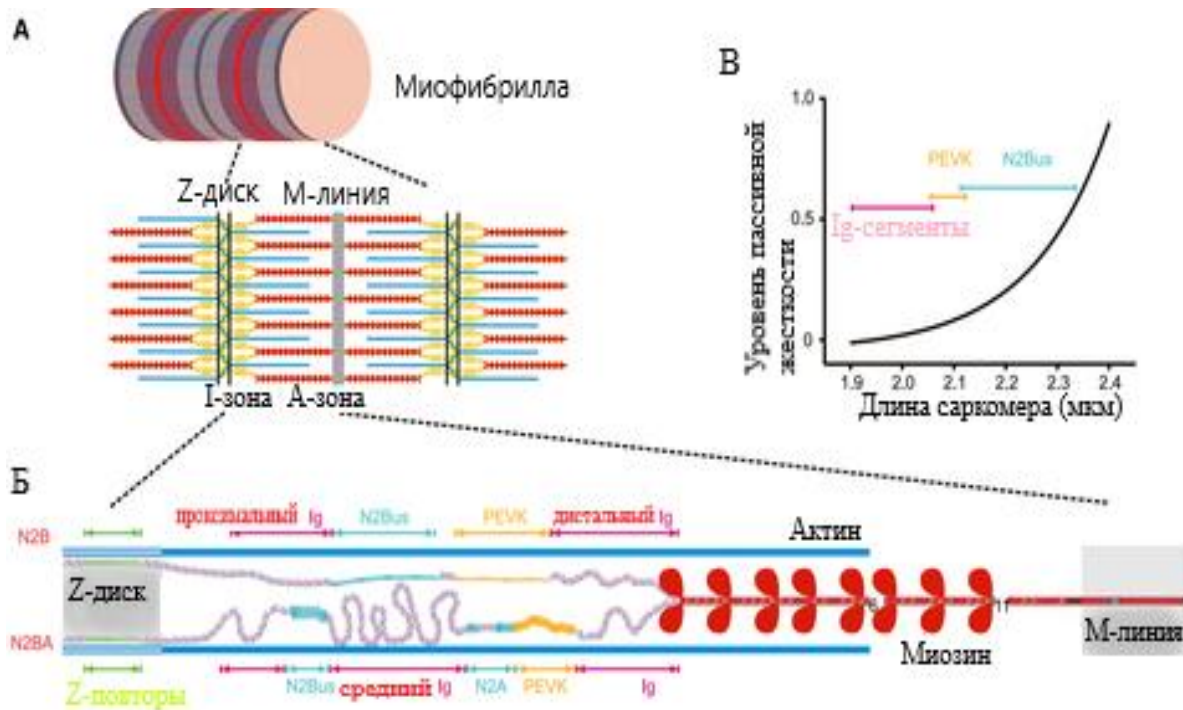


Рисунок 1 – Изоформы тайтина и механизм растяжения саркомера

Примечание: Схематическое изображение миофибриллы, состоящей из саркомеров (ограничены Z–дисками), которые состоят из трех миофиламентных систем: актиновых (тонких), миозиновых (толстых) и тайтиновых (эластичных) (А). Саркомер показан в двух состояниях растяжения (Б). Отношение силы пассивного натяжения к длине саркомера. Цветом показана последовательность растяжения структур саркомера N2B изоформы (В) [95]

Дифференциальный сплайсинг гена тайтина является основой для многочисленных изоформ тайтина с молекулярной массой от 7 КДа до 3,7 МДа. Большинство событий альтернативного сплайсинга происходят в I–зоне тайтина, но в меньшей степени они влияют на Z–диск и M–линию молекулы [102]. Молекулярные механизмы, которые контролируют сплайсинг тайтиновой матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК), до сих пор не полностью изучены, но недавние исследования определили фактор сплайсинга RBM20 в качестве важного участника в этом процессе [64, 115].

Основной функцией тайтина является поддержание целостности миофибриллы и саркомера в процессе сокращения и расслабления мышечной ткани [118]. Также он выполняет дополнительные функции, такие как обеспечение организации саркомера в процессе развития [187], реализация процесса механочувствительности и механотрансдукции [117], модулирование сигнального ответа кардиомиоцита и процесса аутофагии [55, 152].

1.2 Тайтин и механотрансдукция

В начале 20 века Эрнест Старлинг и Отто Франк независимо друг от друга открыли фундаментальный принцип в физиологии сердечной мышцы, согласно которому сила сокращения волокон прямо пропорциональна величине их растяжения [90]. Данный принцип работает и при патологии сердечной мышцы, однако при различных вариантах патологии миокарда происходит замедление активации сокращения сердечной мышцы в ответ на растяжение [75, 172]. В 2001 году Касорла и соавт. обнаружили, что чувствительность к Ca^{2+} зависит в большей степени от пассивного натяжения, чем от длины саркомера [35]. Также они показали, что межфиламентное пространство меняется из-за изменения пассивного натяжения тайтина. На рисунке видно, что тайтин связан с Z-диском в области актина, и таким образом при натяжении создает не только продольную силу, но и поперечную, таким образом приближая актин к миозину, тем самым увеличивая вероятность их соединения между собой (Рисунок 2) [35].

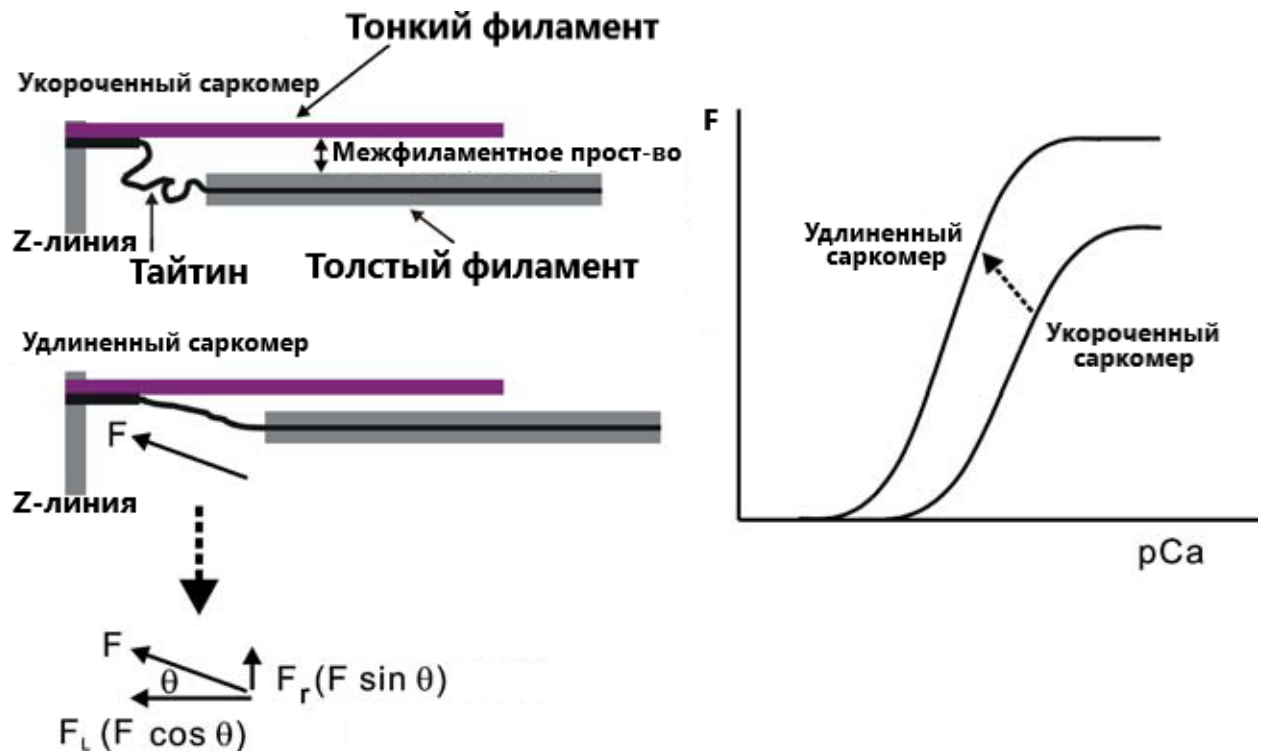


Рисунок 2 – Роль тайтина в генерации межмолекулярного пространства и разница в соотношении сила сокращения – чувствительность к Ca^{2+} в зависимости от длины саркомера [52]

В дальнейшем было подтверждено, что тайтин регулирует силу активации актин-миозиновой аденозинтрифосфатазы и миофиламентов с помощью изменения как длины саркомера, так и посредством изменения межфиламентного пространства [53]. Таким образом, тайтин играет ключевую роль в поддержании пассивной жесткости саркомера и ее изменении при сокращении мышечного волокна путем изменения межфиламентного пространства.

1.2.1 Влияние изоформ тайтина на жесткость и растяжимость саркомера

В сердце млекопитающих экспрессируется две основных изоформы тайтина: более длинную и менее жесткую N2BA изоформу (3,2 – 3,7 МДа), и более короткую и более жесткую N2B изоформу (3,0 МДа), которые получают путем альтернативного сплайсинга. Во время своего развития сердце экспрессирует менее

жесткую фетальную N2BA изоформу, которая заменяется после рождения меньшими по размеру N2BA и N2B изоформами [144]. В зависимости от вида, это соотношение изоформ изменяется более или менее выражено [100]; в сердцах взрослых крыс N2B изоформа преобладает, составляя приблизительно 90% от общего количества тайтина; в то время как в миокарде здорового человека отношение относительной экспрессии составляет около 35% N2BA: 65% N2B [140].

Скелетные мышцы экспрессируют третий тип изоформы под названием N2A (3,3 – 3,7 МДа) со многими мышечно-специфичными вариантами сплайсинга. Также в организме присутствуют три специфичные взаимоисключающие изоформы, содержащие уникальные иммуноглобулиновые домены, локализованные в определенных экзонах: *novex-1* (экзон 45), *novex-2* (экзон 46) и *novex-3* (экзон 48) [20]. Изоформы *novex-1* и *novex-2* имеют длину около 3000 кДа и по своей структуре схожи с изоформой N2B [17, 163] (Рисунок 3). Рибонуклеиновая кислота (РНК) *novex-3* отличается от других наличием стоп-кодона и полиА хвоста, что в свою очередь приводит к ее малым размерам (700 кДа). В миокарде данная изоформа формирует комплекс с белком обскурином, локализующийся в области Z-диска, который обеспечивает регуляцию Ca^{2+} , а также гуанозинтрифосфат – и SH_3 -ассоциированных миофибриллярных сигнальных путей.

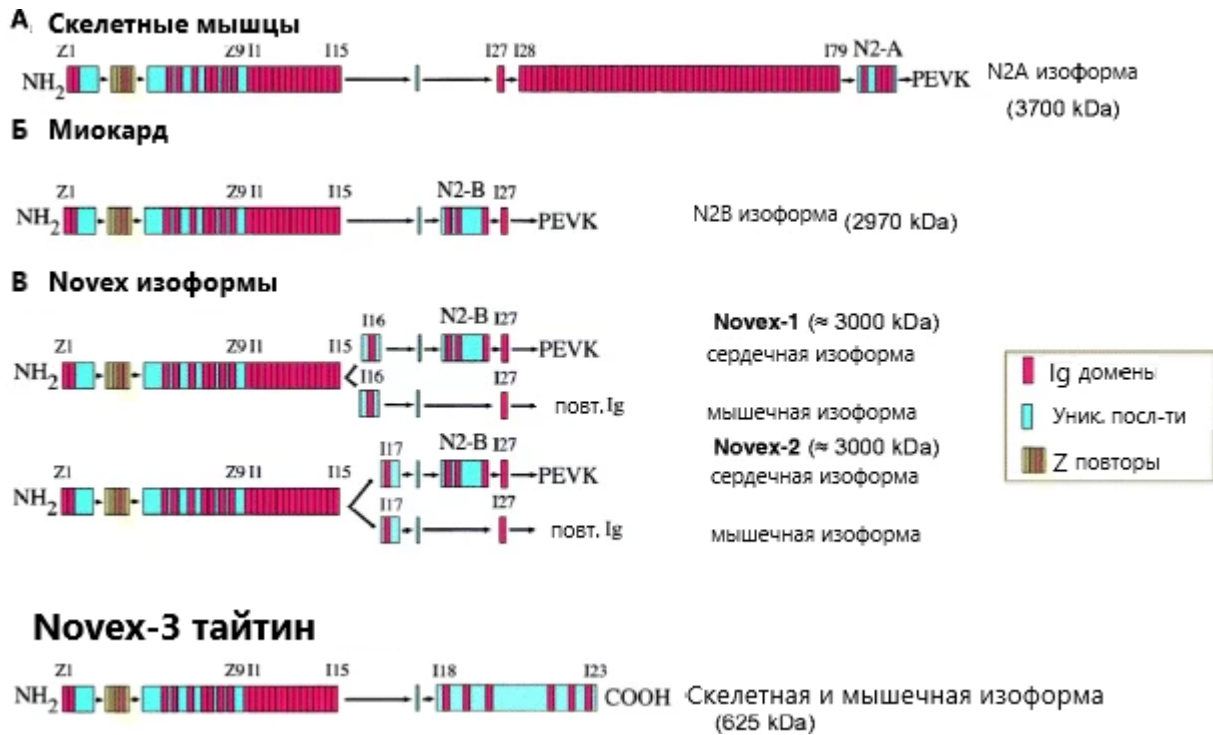


Рисунок 3 – Изоформы тайтина [20]

Как было указано выше, в сердце взрослого здорового человека экспрессируется 30–40% N2BA и 60–70% N2B изоформ тайтина [140]. Кроме того, правые отделы сердца экспрессируют большее количество N2BA чем левые, а предсердия содержат больше N2BA чем желудочки [141].

При различных заболеваниях сердечно–сосудистой системы соотношение изоформ изменяется. Так, например, повышение уровня экспрессии изоформы N2BA происходит при негенетических формах КМП [140], при ДКМП [126, 138] и сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса [25], а также у профессиональных спортсменов [92]. При аортальном стенозе, напротив, происходит повышение экспрессии N2B изоформы [25]. Если суммировать данные различных исследований, то при эксцентрическом ремоделировании сердца происходит увеличение экспрессии N2BA изоформы, что приводит к снижению пассивной жесткости, и, напротив, при концентрическом ремоделировании миокарда

с диастолической дисфункцией происходит уменьшение экспрессии N2BA изоформы, приводящее к увеличению пассивной жесткости [118] (Рисунок 4).

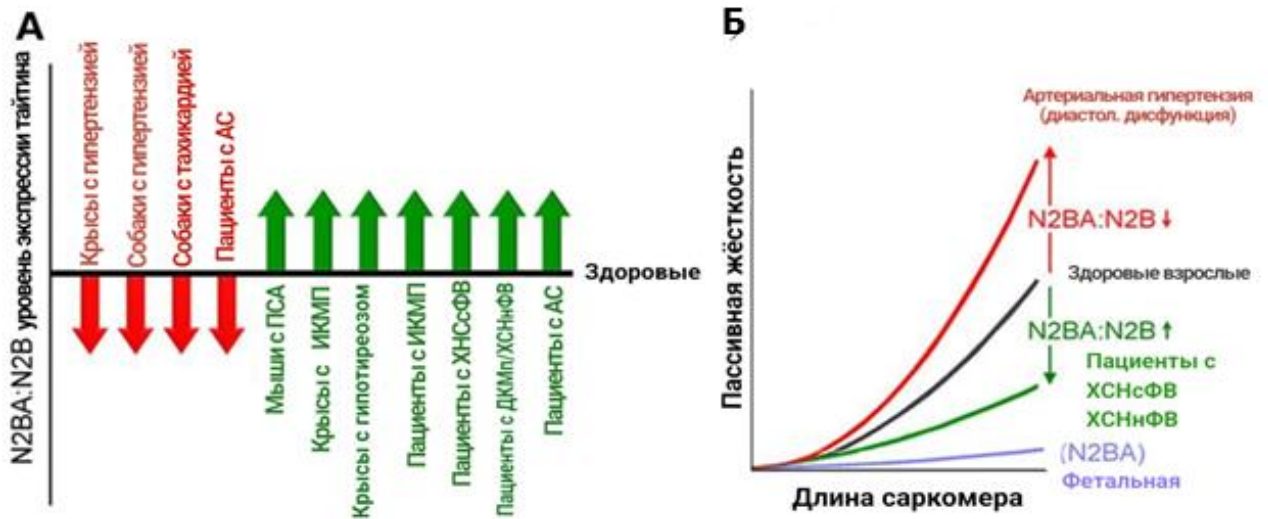


Рисунок 4 –Изменения соотношения экспрессии N2BA:N2V изоформ тайтина[118]

Примечание: по сравнению со здоровым взрослым миокардом у людей и лабораторных животных (А). Изменения соотношения экспрессии N2BA:N2V изоформ тайтина, и как следствие изменение пассивной жесткости миокарда у различных групп пациентов (Б), АС – аортальный стеноз, ПСА – поперечное сужение аорты, ИКМП – ишемическая кардиомиопатия

Ключевым фактором регуляции экспрессии различных изоформ тайтина является фактор сплайсинга РНК-связывающая последовательность белка-20 (RBM-20), который также регулирует сплайсинг 30 других генов, таких как *SAMK2D*, *SACNA1C*, *LDB3*, *TPM1* [64, 115]. Большинство из них экспрессируются в мышечной ткани, и многие из них (*SAMK2D*, *LDB3*, *DTNA*, *TPM1*, *KCNIP2*) ассоциированы с развитием ДКМП или сердечной недостаточности [68]. RBM20 увеличивает экспрессию N2V изоформы, а патогенные варианты в соответствующем гене *RBM20* приводят к изменению нормального соотношения изоформ тайтина в саркомере со сдвигом в сторону менее жесткой N2BA, что в свою очередь обуславливает развитие

ДКМП [67]. Также механизм регуляции экспрессии изоформ тайтина включает в себя активацию/ингибирование фосфатидилинозитол-3-киназы (ФИЗК), являющейся звеном рапамицинового пути, активация которого происходит при увеличении тиреоидного гормона [103], инсулина [99] и ангиотензина II [103], а ингибирование осуществляется через блокирование самой фосфатидилинозитол-3-киназы или ее рецептора непосредственно рапамицином (Рисунок 5) [100, 104]. При снижении уровня агонистов ФИЗК происходит относительное увеличение экспрессии изоформы N2BA.

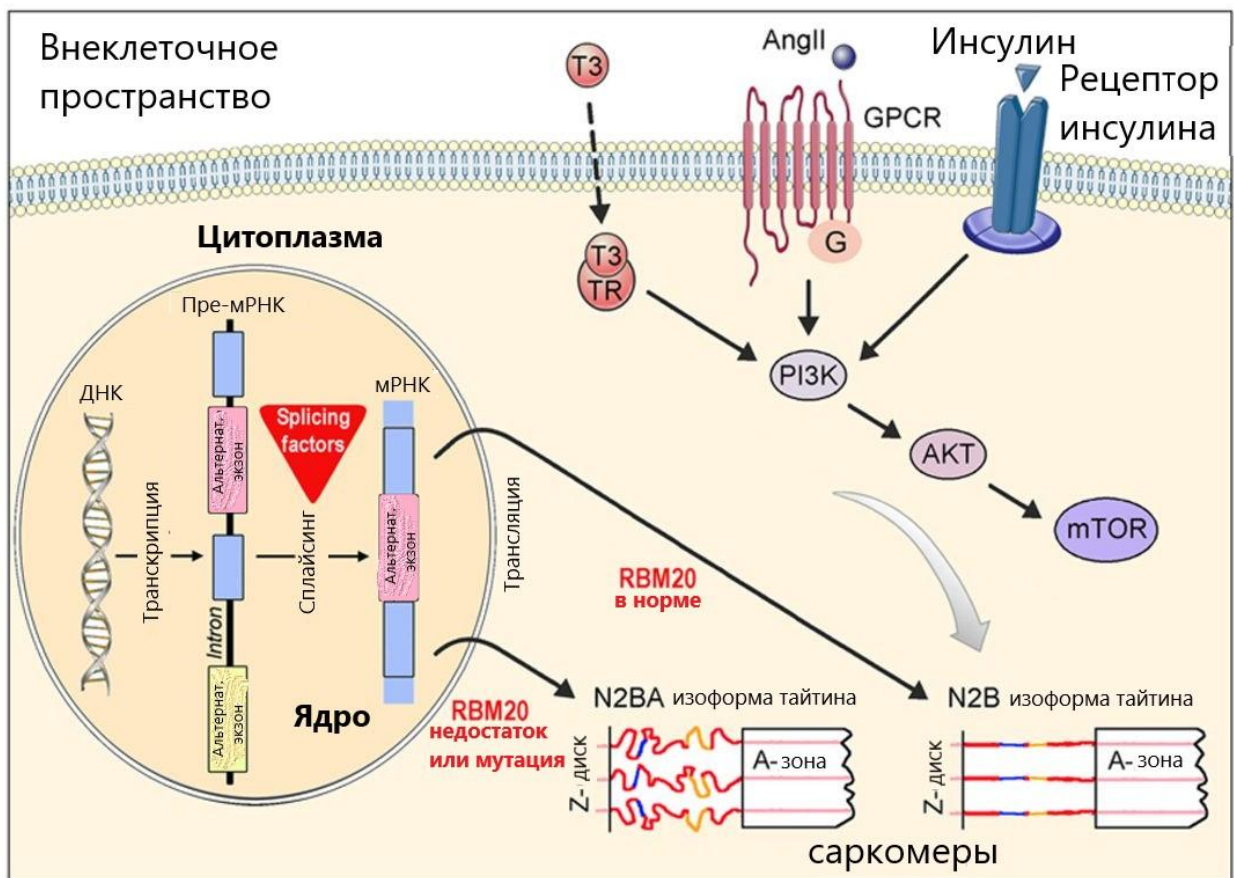


Рисунок 5 – Молекулярный механизм изменения экспрессии изоформ тайтина

Примечание: AngII – ангиотензин II, G – G-белок, GPCR – рецептор G-белка, mTOR – рецептор рапамицина млекопитающих, PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа, RBM20 – РНК-связывающая последовательность белка-20, T3 – тиреоидный гормон, TR – рецептор тиреоидного гормона [118]

1.2.2 Регуляция жесткости молекулы тайтина посредством фосфорилирования

Фосфорилирование белков саркомера является достаточно распространенным механизмом регуляции сократительной функции миофиламентов. Так, например, фосфорилирование тропонина I и миозин-связывающего белка-C приводит к изменению Ca^{2+} -чувствительности миофиламентов [188]. Тайтин является ключевым из белков, в большей степени вовлеченных в процесс фосфорилирования, согласно базам данных существуют тысячи потенциальных сайтов его фосфорилирования [87, 124]. Влияние фосфорилирования тайтина по различным сайтам разнонаправлено влияет на его жесткость и на биомеханику миокарда в целом. Первым ферментом, описанным в связи с фосфорилированием тайтина была протеинкиназа A, чей сайт фосфорилирования располагался в N2Bus-домене [196] (Рисунок 6). Фосфорилирование миокард-специфичной N2Bus-последовательности с помощью cAMP- [102] и cGMP- [101] зависимых протеинкиназ, CaMKII δ [76] и предположительно ERK2 [159], увеличивает постоянную длину этого участка и, тем самым, уменьшает пассивную жесткость миокарда. Напротив, фосфорилирование домена PEVK Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой Ca уменьшает постоянную длину PEVK домена и вызывает увеличение пассивной жесткости тайтина [82]. Остается не до конца исследованным, почему добавление фосфатов в одной области молекулы приводит к увеличению жесткости тайтина, тогда как оно же вызывает уменьшение при фосфорилировании в другом сайте. Возможно, введение отрицательно заряженной фосфатной группы в уже отрицательно заряженную среду, такую как N2-Bus, может оказать противоположное влияние по сравнению с внедрением его же в положительно заряженную последовательность, такую как PEVK. Данные изменения могут привести к внутримолекулярному электростатическому отталкиванию, тем самым изменяя постоянную длину доменов [97].

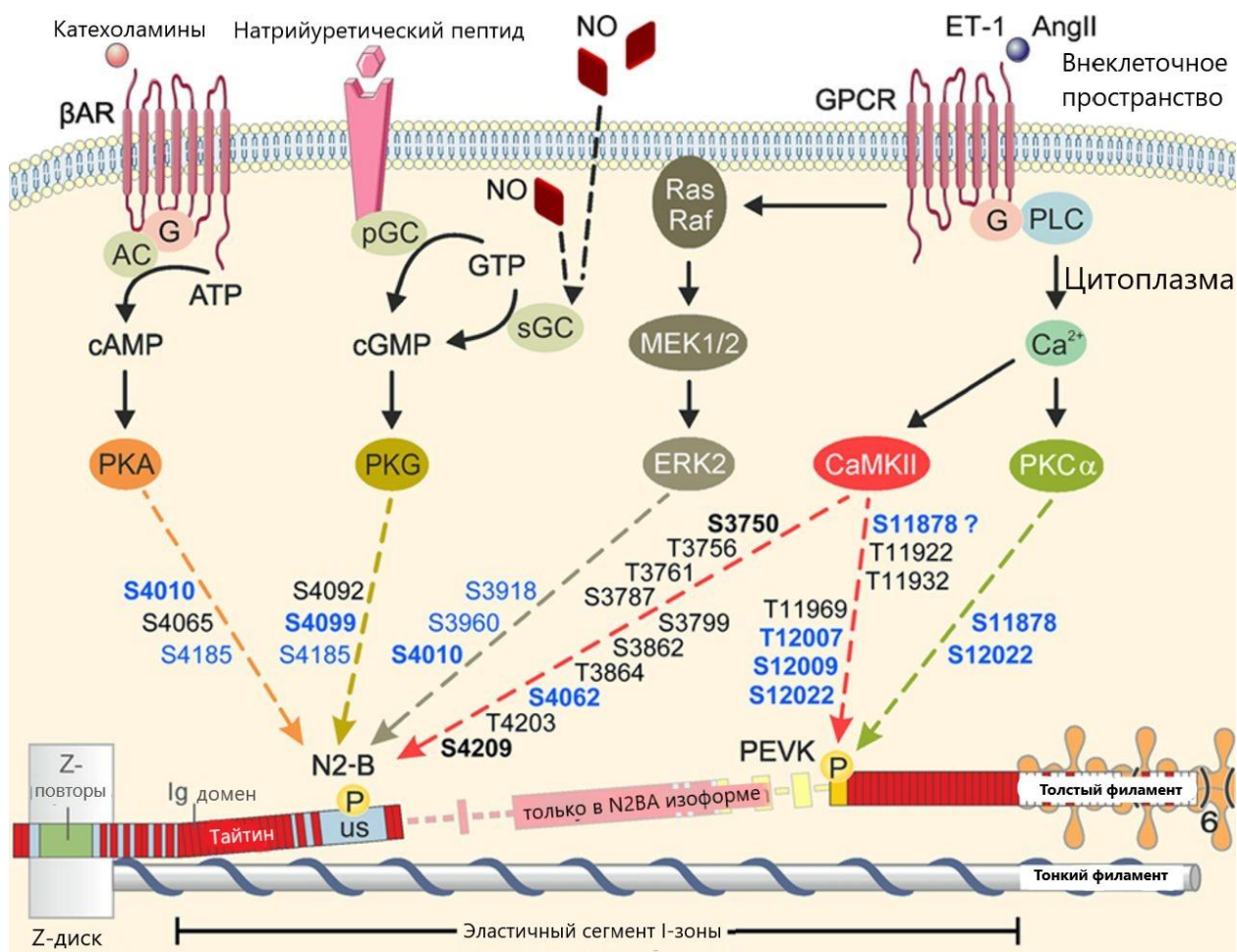


Рисунок 6 – Фосфорилирование N2B-последовательности и PEVK-домена молекулы тайтина

Примечание: βAR – бета адренергические рецепторы, AC– аденилат циклаза, AngII– ангиотензин II, CaMKII– Ca²⁺ кальмодулин–зависимой протеинкиназа II, ERK2– внеклеточной сигнал–регулируемой киназа –2, ET–1– эндотелин–1, G– G–белок, GPCR– рецептор G–белка, NO– оксид азота, PEVK–участок тайтина богатый пролином, глутамином, валином и лизином, pGC– неактивная гуанидин циклаза, PKA–протеин киназа A, PKC–протеин киназа C, PKG–протеин киназа G, sGMP–зависимая протеин киназа–G, PLC–фосфолипаза–C, Raf–белок крысиной фибросаркомы, Ras–белок крысиной саркомы, sGC–растворенная гуанидин циклаза, us– уникальная последовательность [118]

Постоянные изменения в статусе фосфорилирования тайтина без сопутствующих изменений экспрессии его изоформ отмечены в различных исследованиях по анализу биопсий у пациентов с сердечной недостаточностью, где

показана связь процесса фосфорилирования с изменением жесткости миокарда. Например, у пациентов с конечной стадией ДКМП наблюдалось снижение фосфорилирования протеинкиназой G по сравнению со здоровыми людьми [101]. Другие исследования показали снижение общего уровня фосфорилирования тайтина у пациентов с ГКМП и сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса, а также в экспериментальных работах на животных [70, 71]. Однако может наблюдаться и обратная ситуация, когда изменение соотношения N2BA:N2B не сопровождается изменением уровня фосфорилирования тайтина, такое явление было показано при исследовании миокарда пациентов с далеко зашедшей стадией ДКМП [97]. При этом все же стоит учитывать не общий уровень фосфорилирования молекулы, а определять конкретные сайты, по которым произошло фосфорилирование, так как фосфорилирование одних и тех же аминокислотных последовательностей в структуре N2-Bus или PEVK может приводить к противоположным эффектам. В патологически измененной сердечной мышце активность протеинкиназ A и G как правило снижена, а PKC α и CaMKII δ наоборот повышена, и если нарастание активности PKC α и CaMKII δ нейтрализуется их противоположным эффектом, то недостаточная активность PKA и PKG приводит к увеличению пассивного натяжения тайтина и, соответственно диастолической жесткости саркомера [22, 76] (Рисунок 7А). Подтверждением данной теории является тот факт, что патологически высокая жесткость изолированных кардиомиоцитов у пациентов с сердечной недостаточностью и аортальным стенозом под действием протеинкиназ A и G снижается [76, 126] (Рисунок 7Б). В дополнение показано, что действие протеинкиназы G в отношении влияния на жесткость тайтина более эффективно, чем протеинкиназы A [74].

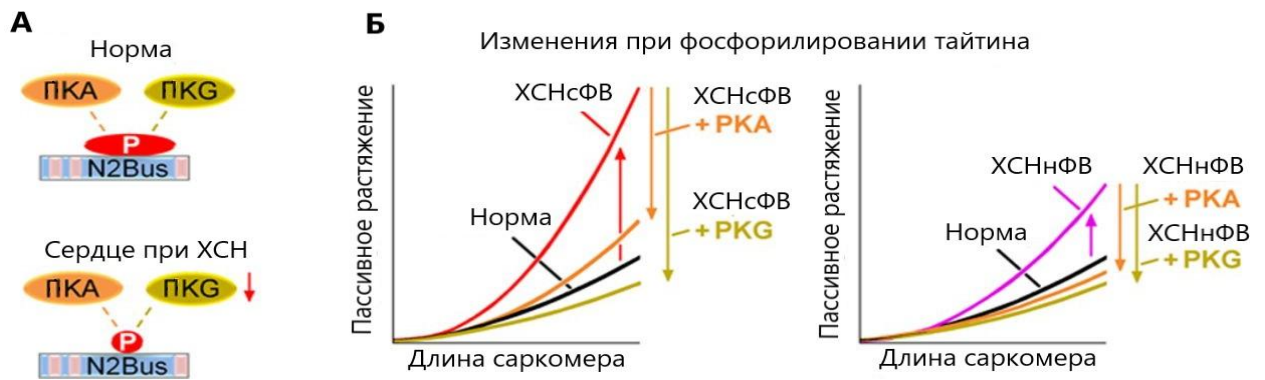


Рисунок 7 – Изменение фосфорилирования тайтина [118]

Примечание: Изменение фосфорилирования при нарушении работы сердца (А) и изменения жесткости кардиомиоцитов у пациентов при хронической сердечной недостаточности и влияние протеинкиназ А и G (Б)

1.2.3 Посттрансляционные модификации тайтина, связанные с кислородным голоданием

Жесткость тайтина зависит от эффективности дыхания, окислительного фосфорилирования и кислородного голодания посредством нескольких механизмов. Во-первых, кислая среда способствует беспорядочному образованию дисульфидных мостиков в N2-Bus последовательности, что приводит к повышению пассивной жесткости [67], во-вторых, кислородное голодание запускает механизмы, приводящие к разворачиванию Ig-доменов, что способствует их глутатионированию или образованию дисульфидных связей (Рисунок 8) [17]. Данное явление приводит к ослаблению стабильности Ig-доменов и невозможности их обратной компактной сборки и, соответственно, снижению пассивной жесткости [17]. Третьим механизмом, определяющим взаимосвязь окислительного фосфорилирования и жесткости тайтина, является изменение сигналинга протеинкиназы G. Кислородное голодание снижает биодоступность оксида азота, понижая активность гуанидинциклазы и повышая уровень циклогуанозинмонофосфат-специфичной фосфодиэстеразы-5А, приводя в конечном итоге к снижению cGMP-PKG

сигналинга [24]. Снижение активности протеинкиназы G приводит к недостаточному фосфорилированию тайтина, повышая пассивную жесткость молекулы и, в конечном счете, приводя к формированию диастолической дисфункции [118]. Это объясняет развитие диастолической дисфункции у пациентов с сердечной недостаточностью при сохраненной фракции выброса, так как у них имеются множественные причины кислородного голодания кардиомиоцитов, такие как нарушение метаболизма, ожирение, сахарный диабет (СД), почечная недостаточность, артериальная гипертензия [148].

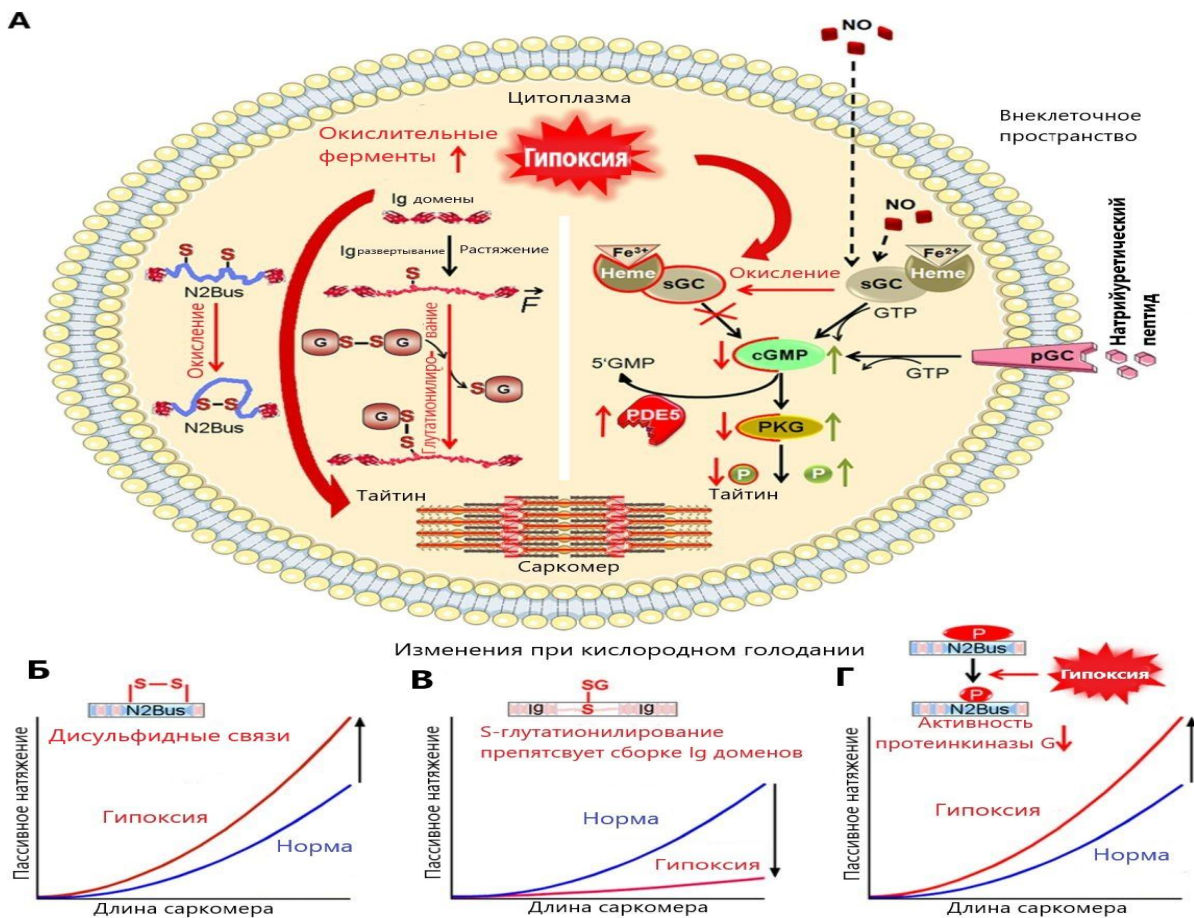


Рисунок 8 – Изменения жесткости тайтина, вызванные кислородным голоданием [118]

Примечание: Образование дисульфидных мостиков, глутатионирование Ig-доменов, снижение активности протеинкиназы G (А). Влияние данных процессов на пассивную жесткость молекулы тайтина (Б–Г)

1.3 Тайтин и структурные особенности миокарда. Варианты гена тайтина в контрольной группе, укорачивающие варианты гена *TTN*

Существует четыре типа генетических вариантов, приводящих к мутациям с потерей функции белка (loss-of-function mutations). К ним относятся нонсенс-мутации, мутации в сайте сплайсинга, инсерции и делеции со сдвигом рамки считывания, а также замены в старт-кодоне [195]. Все они приводят к синтезу неполного белка, и как следствие, чаще всего к его гаплонедостаточности. В случае с тайтином, данные варианты называются укорачивающими (truncated variants (*TTNtv*)) [192], зачастую не являются патогенными и встречаются в популяции с частотой в диапазоне от 1 до 3 % [184, 192]. Патогенность укорачивающих вариантов напрямую связана с их локализацией: присутствие *TTNtv* в экзонах с низким уровнем процента сплайсинга, как правило не приводит к развитию КМП или миопатии, и, напротив расположение в конститутивных экзонах, особенно в А-зоне, приводит к развитию соответствующих патологий [73]. Именно *TTNtv* наиболее часто ассоциированы с развитием ДКМП [179], некомпактного миокарда (НМ) левого желудочка (ЛЖ) [78], а также различных миопатий [31, 33, 144], часть из которых характеризуется вовлечением сердца и дыхательных мышц [38].

Считается, что гаплонедостаточность является основным молекулярным механизмом патогенного влияния *TTNtv*, что было доказано на кардиомиоцитах, полученных в результате дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с *TTNtv* или созданных при помощи технологии CRISPR-Cas9 [83]. Однако также не стоит исключать и механизм, в основе которого лежит синтез токсического пептида, так, например, к развитию ДКМП чаще приводят *TTNtv*, находящиеся в А-зоне тайтина [168], а среди здоровых носителей *TTNtv* данные генетические варианты у 26% расположены в экзонах с минимальным уровнем экспрессии в сердечной мышце, а еще у 20% расположены в экзонах, присутствующих только в длинной изоформе N2BA [163, 167]. При исследовании

кардиомиоцитов, полученных в результате дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, было показано, что *TTNtv* приводят к уменьшению и дезорганизации саркомеров, снижению ответа на адренергическую стимуляцию и стимуляцию фактором роста [83]. На молекулярном уровне было показано подавление функционирования главных сигнальных путей, критически важных для функционирования кардиомиоцита [83]. Кроме того, *TTNtv* приводят к изменениям в нормальном метаболизме сердечной мышцы, снижая потребление длинноцепочечных жирных кислот, характерное для здорового сердца, и увеличивая гликолиз [168]. Обычно такие изменения в метаболизме случаются в качестве краткосрочного ответа на различного рода стрессы [40, 108, 176, 183]. Однако длительное накопление промежуточных продуктов гликолиза и разветвленных аминокислот приводит к активации сигналинга серин/треонинпротеинкиназы mTOR комплекса 1 [141, 170], что в свою очередь активирует бесполезные циклы синтеза белка, подавляя аутофагию, что является дезадаптивным ответом [156, 197].

Влияние *TTNtv* на физиологию сердечной мышцы было продемонстрировано в нескольких экспериментальных исследованиях на моделях грызунов [125, 155]. В отсутствие стресса *TTNtv* имели крайне ограниченный эффект на строение и работу сердечной мышцы, однако, при фармакологическом или гемодинамическом стрессе в мышечных сердцах с *TTNtv* развивалось эксцентрическое ремоделирование и систолическая дисфункция, сопровождающаяся фиброзным замещением [61, 88]. На исследованиях, проведенных *ex vivo*, сердца крыс с *TTNtv* имели нормальные показатели гемодинамики, однако не обеспечивали адекватный ответ на повышение нагрузки, что быстро приводило к развитию систолической дисфункции [170]. Таким образом, при обычной физиологической нагрузке в сердечной мышце с *TTNtv* происходит компенсация дисфункции тайтина посредством изменения метаболизма и изменения регуляции сигнальных путей, но при чрезмерной нагрузке происходит быстрый срыв адаптации и развивается декомпенсация [192]. На макроуровне структурные и функциональные изменения в миокарде пациентов с *TTNtv* были

обнаружены при помощи магнитно–резонансной томографии, которые показали увеличение размеров левого желудочка, снижение сократимости и легкую степень эксцентрического ремоделирования [168].

Помимо *TTNtv*, которые наиболее очевидно ассоциированы с патологией миокарда, в гене *TTN* на сегодняшний день известно более 60,000 однонуклеотидных вариантов [131]. Большинство из них являются доброкачественными или их патологического эффекта недостаточно для развития заболевания, но они могут выступать в качестве вариантов–модификаторов при наличии патогенных вариантов в других генах [64]. Данное предположение было доказано на примере большой семьи с ДКМП, в которой при полноэкзомном секвенировании были выявлены члены, имевшие одновременно однонуклеотидные мутации в генах *TTN* и *LMNA*, что проявлялось более тяжелым фенотипом с ранним началом заболевания по сравнению с носителями одного патогенного варианта [165]. Интересно, что распространение патогенных и нейтральных однонуклеотидных вариантов вдоль молекулы белка неравномерно: большинство из патогенных вариантов находятся в А–зоне молекулы (как и в случае с *TTNtv*) [80], а именно в С–зоне, состоящей из 11 Ig–доменов и Fn–III доменов, отвечающих за связь с субфрагментом–1 миозина и снижающих чувствительность к Ca^{2+} при укорочении саркомера [137].

1.4 Генетические варианты тайтина и врожденные заболевания миокарда

Впервые связь мутаций в гене *TTN* с развитием наследственных заболеваний была показана в 1998 году, когда при помощи генетического картирования была доказана связь развития большеберцовой мышечной дистрофии с хромосомным локусом 2q31 [77]. В 1999 году было обнаружено, что этот же локус 2q31 связан с развитием ДКМП [177]. В этих исследованиях предполагалось, что именно ген *TTN* ответственен за развитие данных патологий, но подтвердить это не удавалось в связи с огромными размерами гена и невозможностью его полного секвенирования на тот момент. Только в 2002 году на примере двух неродственных пациентов с ДКМП

было продемонстрировано, что именно мутации в гене *TTN* приводят к развитию данной патологии [63]. Сложность секвенирования гена *TTN* из-за его большого размера долгое время оставалась препятствием для изучения его ассоциации с развитием различных кардиомиопатий. Внедрение секвенирования нового поколения позволило провести более масштабные генетические исследования пациентов с ДКМП, по результатам которых частота *TTNtv* у пациентов с семейной формой составляла от 18% до 27%, а среди всех пациентов с данной патологией от 11% до 22% [68, 78, 153, 163]. Таким образом был сделан вывод о том, что тайтин-укорачивающие мутации вносят решающий вклад в развитие ДКМП. В дальнейших исследованиях было обнаружено, что *TTNtv* у пациентов с ДКМП чаще встречаются в А-зоне молекулы тайтина, по сравнению с контрольной группой. Также было показано, что пациенты с ДКМП и наличием *TTNtv* в 44% случаев в дополнение несут ранее известную патогенную мутацию в одном из 84 генов, ассоциированных с развитием данной патологии [72].

Гипертрофическая КМП является наиболее распространенным наследственным типом КМП, поражая примерно 0,2% популяции и характеризуется гипертрофией (утолщением) стенки левого и/или изредка правого желудочка. В большинстве случаев, ГКМП наследуется по аутосомно-доминантному типу, и 50–65% обусловлены мутациями в 11 генах, кодирующих белки саркомера [127, 133]. Согласно данным, полученным при помощи секвенирования нового поколения, мутации в гене *TTN* приводят всего к 1,3–4% от всех случаев ГКМП. При этом уровень *TTNtv* в контрольной популяции составляет около 3% [78, 123], что ставит под вопрос причинную роль генетических вариантов тайтина в отношении ГКМП. Однако довольно часто мутации в гене *TTN* сочетаются с патогенными вариантами в других генах белков саркомера. По мнению исследователей, данные мутации являются модулирующим фактором ГКМП, а не его первичной причиной [61].

Рестриктивная КМП характеризуется повышенной жесткостью стенок желудочков, приводящей к развитию диастолической дисфункции на фоне обычно

сохраненной систолической функцией сердца, которая сопровождается выраженным расширением предсердий [127]. В 2014 году была найдена мутация у шести членов одной семьи в А-зоне тайтина (с.50057A>G; р.Tyr16686Cys), локализуемая в 267 экзоне с уровнем PSI (процента сплайсинга) 100%, кодирующем домен фибронектина тип-3 9, приведшая к развитию РКМП [150].

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка характеризуется фиброно-жировым замещением миокарда, преимущественно правого желудочка, приводящее к желудочковой аритмии или внезапной смерти [127]. Наиболее частой причиной развития данной патологии являются нарушения в структуре белков вставочных дисков [89]. На данный момент доказана связь для крайне малого количества мутации в гене *TTN* с развитием аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка [185]. На сегодняшний день роль генетических вариантов тайтина в развитии АКМП крайне дискуссионна, так как многие считают их лишь модифицирующим фактором фенотипа для данной патологии [36, 90].

Также на сегодняшний день доказана связь мутаций в гене тайтина с развитием некомпактного миокарда левого желудочка. Некомпактный миокард (левого желудочка) – редкая форма кардиомиопатии, характеризующаяся остановкой нормального процесса уплотнения миокарда, приводящей к сохранению множественных выраженных желудочковых трабекул и глубоких межтрабекулярных карманов [153]. Клинически проявляется сердечной недостаточностью, аритмией, тромбоэмболическим синдромом [20]. При этом данная патология крайне сложна для диагностики, так как наличие незначительных морфологических изменений по данным эхокардиографии (ЭхоКГ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ) не является достаточным для определения патологического состояния согласно популяционным исследованиям [51, 106]. В зависимости от исследуемой группы доля наследственных форм для данной КМП составляет от 18% до 44% [120, 140]. Эта форма КМП может возникнуть из-за мутации в гене, приводящей к нарушению физиологического уплотнения

развивающегося эмбрионального миокарда, которое обычно распространяется от основания к верхушке сердца. Другие случаи наблюдаются спорадически или даже могут быть приобретенными (например, у спортсменов и беременных женщин) [105, 110]. Кроме того, фенотип НМ может быть найден у членов семей, пораженных другими типами КМП, что поднимает вопрос о том, является ли некомпактный миокард основой для развития других КМП. В то время как Американская кардиологическая ассоциация классифицирует некомпактный миокард в качестве независимого варианта генетически–обусловленной кардиомиопатии, а Европейское общество кардиологов определяет его как один из типов неклассифицированных КМП [118]. Чаще всего данный тип кардиомиопатии обусловлен мутациями в генах белков саркомера, вставочных дисков и ядерных структур, среди них возможны и причинные варианты в гене *TTN* [110]. В 2017 году было опубликовано исследование, включающее 95 пациентов, страдавших некомпактным миокардом ЛЖ и показано, что наиболее частой причиной развития были *TTNtv* (19%), преимущественно локализованные в А– зоне тайтина (Рисунок 9) [173].

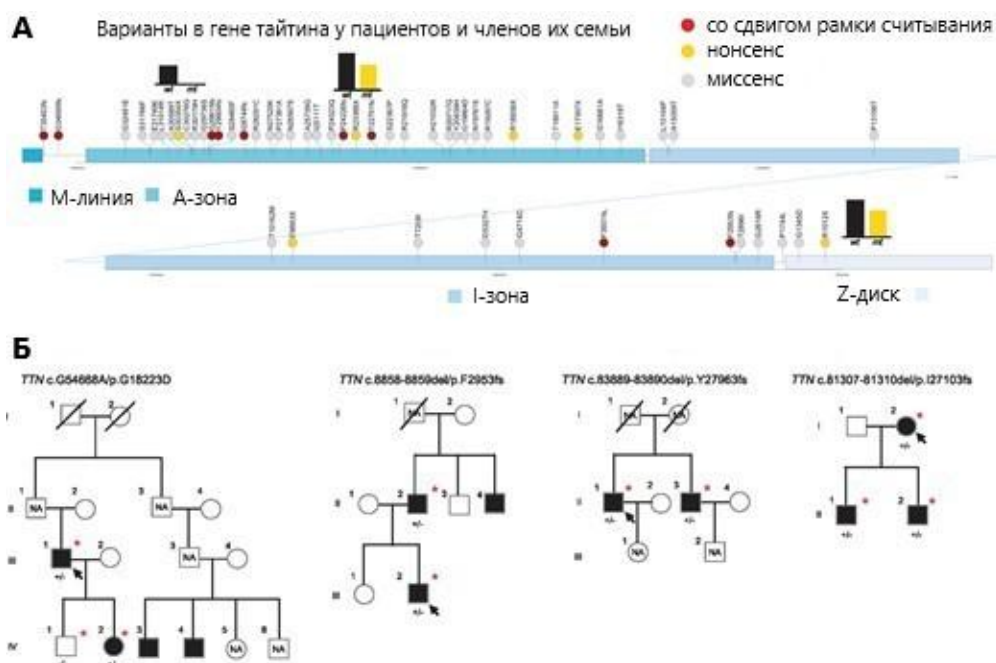


Рисунок 9 –Доменная структура тайтина с распределением укорачивающих вариантов в гене *TTN* при некомпактном миокарде [173]

Примечание: Для трех нонсенс мутаций, показано снижение уровня экспрессии в мутантных аллелях (желтый) по сравнению с аллелью дикого типа (черный) (А). Родословные карты пациентов с некомпактным миокардом левого желудочка, обусловленных мутациями в *TTN* (Б)

Как уже было сказано выше, частота *TTNtv* среди контрольной группы составляет около 1–3%, что крайне усложняет определение степени патогенности выявляемых вариантов и требует проведения подтверждающих функциональных исследований. В недавних исследованиях были определены признаки, позволяющие дифференцировать патогенные укорачивающие варианты от доброкачественных. Помимо стандартных критериев, таких как присутствие у нескольких пациентов и тип мутации, были отмечены те, что затрагивают механизм сплайсинга молекулы тайтина. Roberts с соавт. предположили, что варианты, присутствующие во всех миокардиальных транскриптах и локализованные в постоянно экспрессирующихся экзонах вносят наибольший вклад в развитие патологии и имеют наибольшую вероятность являться причинными в отношении развития КМП [164]. Для определения присутствия исследуемой изоформы (вследствие сплайсинговых

механизмов) в миокарде и доли (процента) присутствия данной сплайсинговой формы среди миокардиальных транскриптов было использовано РНК-секвенирование сердечной ткани пациентов с конечной стадией ДКМП и здоровых доноров. Процент сплайсинга показывает уровень экспрессии определенного экзона среди всех изоформ. Мутация, затрагивающая экзон с высоким процентом сплайсинга, с большей степенью вероятности может являться патогенной. Также было обнаружено, что 85% экзонов гена тайтина являются симметричными, что в свою очередь не нарушает рамку считывания белка при пропуске экзона. Сочетание низкого процента экспрессии и симметричность экзонов наблюдается в I-зоне молекулы, что обуславливает низкую патогенность мутаций в данной области. И, напротив, *TTNtv*, присутствующие в экзонах с высоким PSI (более 90%), в 98% случаев считаются возможно патогенными (Рисунок 10) [164].

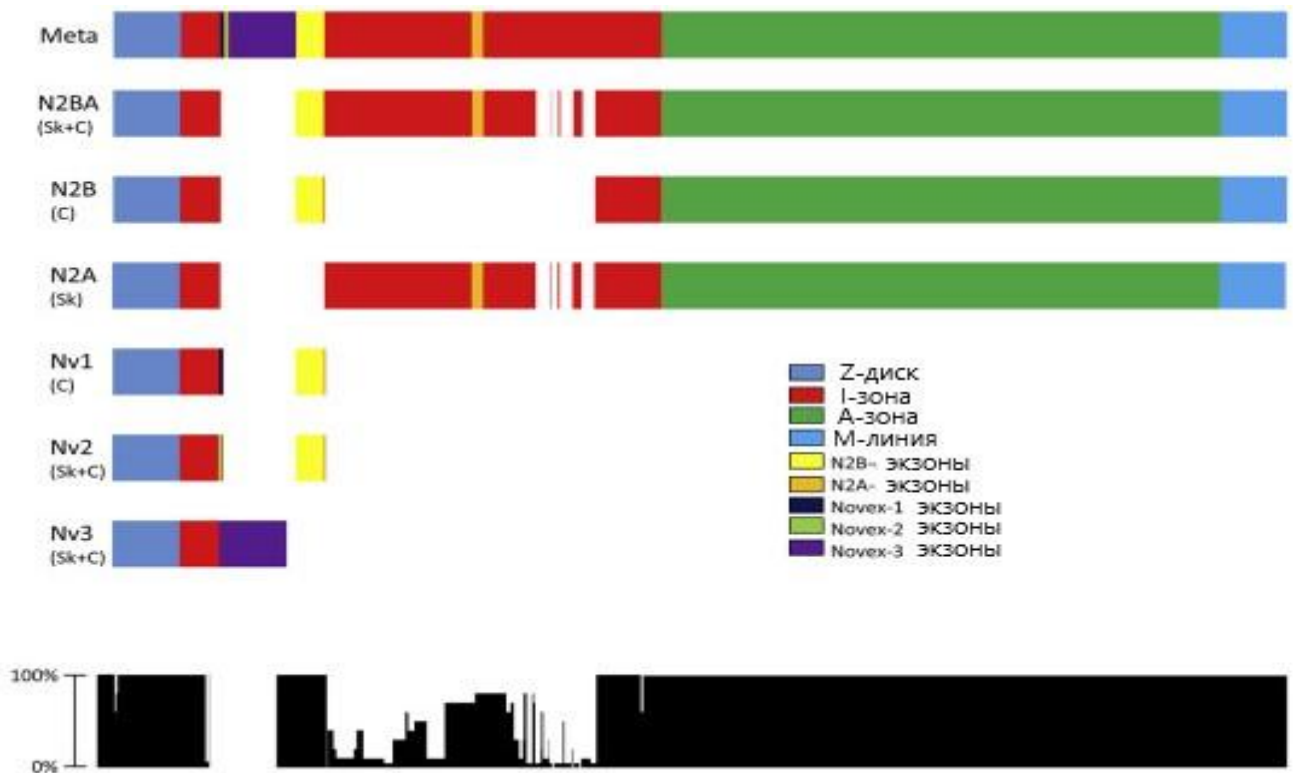


Рисунок 10 – Изоформы тайтина и процент сплайсинга его экзонов [62]

Помимо укорачивающих вариантов, остается мало изученным влияние однонуклеотидных мутаций в гене *TTN* на вероятность развития КМП. В среднем у каждого человека наблюдается 23 однонуклеотидных варианта в *TTN*, диапазон составляет от 6 до 55 [143]. На сегодняшний день не существует надежной системы оценки патогенности однонуклеотидных вариантов в гене *TTN*, патогенность большинства вариантов до конца изучена, однако, как и в случае с *TTNtv*, существуют участки гена, в которых наличие однонуклеотидных вариантов с большей вероятностью приведет к развитию патологии.

Несмотря на то, что наследственные кардиомиопатии являются довольно распространенной патологией, их генетические причины определяются большим количеством редких генетических вариантов в здоровой популяции, осложняющих интерпретацию данных. Большинство *TTNtv* согласно стандартам Американского колледжа медицинской генетики и геномики (ACMG) классифицируются как варианты неопределенной значимости [162], хотя дополнительные характеристики, такие как локализация (A–зона молекулы), высокий процент сплайсинга и семейный характер мутации облегчают определение патогенности. Влияние однонуклеотидных мутаций на развитие КМП остается еще менее изученным вследствие их более широкого распространения. Предполагается, что они могут оказывать модулирующее воздействие на тяжесть течения КМП [131]. Для более полного изучения влияния мутаций на развитие и течение КМП необходимо большее количество фенотип–генетических корреляций и данных секвенирования нового поколения, а также проведение более детальных функциональных исследований.

Важным участником обеспечения сплайсингового созревания гена *TTN* является белок RBM20, кодируемый одноименным геном *RBM20*. Как было описано выше, данный белок помимо тайтина является фактором сплайсинга для более чем 20 белков саркомера, в том числе и ионных каналов.

В 2018 году было показано, что два сериновых остатка в данной последовательности подвергаются в норме фосфорилированию, что обеспечивает ядерную локализацию данного белка. Соответственно, даже однонуклеотидные замены в данной последовательности нарушают ядерную локализацию молекулы RBM20 [138]. Более того, в экспериментальной модели мышей с мутацией p.Ser635Ala, соответствующей варианту (chr10:110812300, NM_001134363.3:c.T1903G:p.Ser635Ala) в гене *RBM20* отмечаются схожее изменение экспрессионного спектра изоформ тайтина, что и при в модели с нокаутированным геном *RBM20* [138]. Данное наблюдение доказывает ключевую роль RSRSP-последовательности в регуляции сплайсинга множества геном внутри ядра, в частности, и молекулы тайтина, приводя к развитию ДКМП.

Помимо описания мутаций в RSRSP-последовательности была доказана патогенность мутации NM_001134363.3:c.G2737A в глутамат-богатом участке молекулы на примере семейного случая КМП с полной пенетрантностью [22]. Однако, большинство однонуклеотидных мутаций обнаружены в спорадических случаях и имеют ограниченные экспериментальные доказательства их влияния на изменения сплайсинга тайтина. Из всех обнаруженных нонсенс-мутаций, на сегодняшний день доказана патогенность только одной – NM_001134363.3:c.G3091T, которая оказывает патогенное воздействие по механизму гаплонедостаточности [171], причем в данном случае пациент гомозиготен по мутантной аллели из-за однородительской дисомии, в то время как его мать, являющаяся носителем, здорова [138].

Ранее считалось, что мутации в гене *RBM20* приводят только к развитию ДКМП, однако в 2017 году было проведено полногеномное секвенирование пациентов с компактным миокардом ЛЖ, в результате которого было найдено четыре редких генетических варианта [173]. Одним из них был NM_001134363.3:c.G1901T, который локализуется в RSRSP-последовательности. Эта замена была также идентифицирована у родителей пробанда, при этом у

пациента не было найдено патогенных вариантов в других генах, ответственных за развитие КМП. При дальнейшем изучении вышеуказанной мутации было показано, что уровень экспрессии мРНК гена *RBM20* не изменяется, однако при изучении мРНК, выделенной непосредственно из ЛЖ и ее сравнении с контролем было обнаружено изменение сплайсинга тайтина, что выражалось в мис-сплайсинге участка I-зоне, содержащей PEVK-домен и иммуноглобулин – насыщенный регион. Далее было проведено измерение уровня люциферазной активности белков, полученный в результате транскрипции мутантных аллелей и их сравнение с положительным контролем и аллелем дикого типа (Рисунок 12). Была получены доказательства измененного процесса сплайсинга с пониженным уровнем пропуска экзонов, приводящая к синтезу более длинных изоформ тайтина. Для подтверждения полученных результатов была получена электрофореграмма выделенных из миокарда белков в агарозном геле, показавший сдвиг в сторону более длинной изоформы тайтина у носителей варианта Arg634Leu (Рисунок 13) [173].

В 2014–2016 годах были проведены экспериментальные исследования на лабораторных животных (грызунах), показавшие возможность коррекции диастолической дисфункции миокарда с помощью изменений сплайсинга незрелой мРНК тайтина, используя *RBM20* в качестве терапевтической мишени [26, 28]. Также были открыты внутри- и внеклеточные сигнальные пути изменения уровня экспрессии различных изоформ тайтина. Например, тиреоидный гормон Т3 способен осуществлять данный процесс на первичных кардиомиоцитах крысы с помощью фосфатидилинозитол-3-киназного пути, а инсулин с помощью PI3K–Akt–mTOR киназной оси [202].

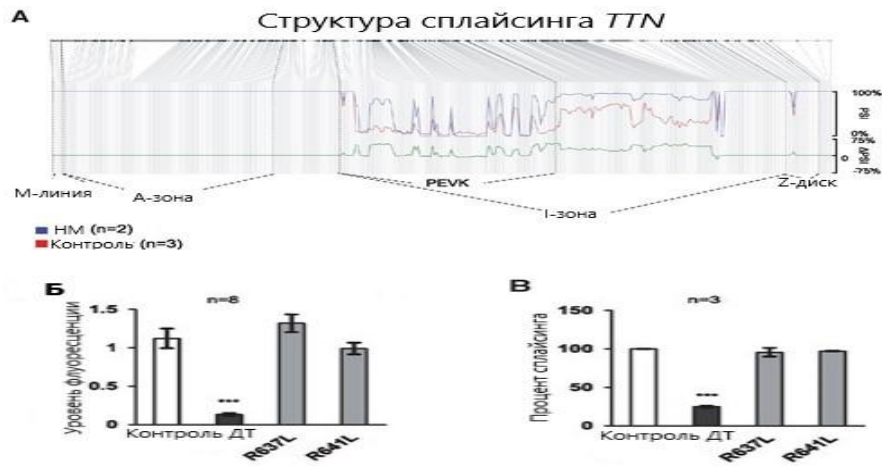


Рисунок 12 – Функциональные доказательства патогенности варианта R634L [173]

Примечание: Сравнение транскриптома миокарда пациентов с некомпактным левым желудочком (голубая линия) и контрольной группы (красная линия). Данные подсчета процента сплайсинга (зеленая линия), показывающие мис-сплайсинг I-зоне, приводящий к удлинению молекулы тайтина (А). Увеличение уровня люциферазной активности в клетках с вариантами R637L и R641L. Контрольные клетки без RBM20 (Б). Увеличение уровня сплайсинговой активности (В)

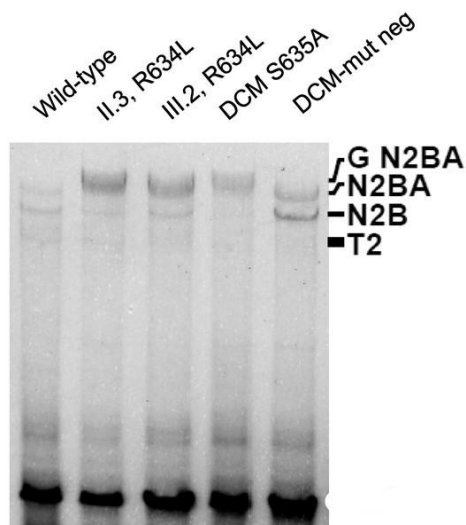


Рисунок 13 – Влияние мутации R634L на экспрессию изоформ тайтина [173]

Примечание: Экспрессия изоформ тайтина в сердечной ткани у здорового человека (Wild-type), пациентов с R634L (II.3 и III.2), пациентов с дилатационной кардиомиопатией и вариантом S635A (DCM S635A) и пациента с дилатационной кардиомиопатией, но без мутаций в гене *RBM20* (DCM-mut neg)

1.5 Тайтин и приобретенные патологии миокарда

Согласно классификации кардиомиопатий Европейского кардиологического общества помимо генетически-обусловленных КМП, также выделяют негенетические (несемейные), подразделяя их в свою очередь на идиопатические и развившиеся в качестве осложнения другого заболевания, таких как AL амилоидоз, болезнь Кавасаки, синдром Чарга–Стросса, гиперэозинофильный синдром [46]. Негенетическая (несемейная) КМП констатируется при отсутствии заболевания у других членов семьи на основании анализа родословной и клинической картины [46]. Ниже мы рассмотрим наиболее частые негенетические типы КМП, не являющиеся осложнениями других заболеваний.

В свою очередь в классификации Американской кардиологической ассоциации КМП подразделяются на первичные и вторичные [127]. При этом, к первичным КМП помимо вызванных генетическими причинами относится, например, перипартальная КМП (ПКМП) [127].

1.5.1 Кардиомиопатии, индуцированные химиотерапией

Кардиомиопатии индуцированные химиотерапией являются осложнением химиотерапевтического лечения, встречаясь у 9% пациентов [33], получающих лечение с помощью антрациклинов. Прогноз сердечной недостаточности, вызванной приемом антрациклинов, крайне неутешителен: уровень смертности в течение 2 лет составляет 60% [47]. Однако при ранней диагностике и начале лечения, прогноз значительно улучшается [33]. В 2017 году было впервые проведено исследование связи *TTNtv* с данным типом КМП, по результатам которого было сделано предположение, что носители *TTNtv* имеют повышенный риск развития сердечной недостаточности при лечении кардиотоксичными химиотерапевтическими препаратами [121]. В 2019 году было проведено более широкое исследование 213 пациентов с данным типом КМП и различными формами рака, в результате которого

TTNtv были найдены у 7,5% пациентов с кардиомиопатиями индуцированные химиотерапией, что было значительно выше уровня *TTNtv* в различных контрольных группах, при этом большинство *TTNtv* были обнаружены в А–зоне и дистальном конце I–зоне молекулы, то есть в тех местах, где обычно располагаются варианты, приводящие к развитию ДКМП [52, 78]. При детальном сравнении пациентов, обладающих *TTNtv*, с аналогичными пациентами с антрациклиновой КМП без *TTNtv* выяснилось, что, несмотря на сопоставимый уровень фракции выброса ЛЖ (34.9 ± 7.4 и 36.8 ± 9.5), пациенты с *TTNtv* чаще госпитализировались и имели более высокий уровень фиброза предсердий, а после лечения фракции выброса (ФВ) ЛЖ была ниже чем в контрольной группе (39.6 ± 14.2 против 48.9 ± 10.8 ; $P=0.03$) [56]. Данные вышеизложенных исследований были подтверждены экспериментально: прием антрациклинов вызвал длительную дисфункцию ЛЖ у мышей с *TTNtv*, при отсутствии значимой патологии у мышей дикого типа (Рисунок 14) [56].

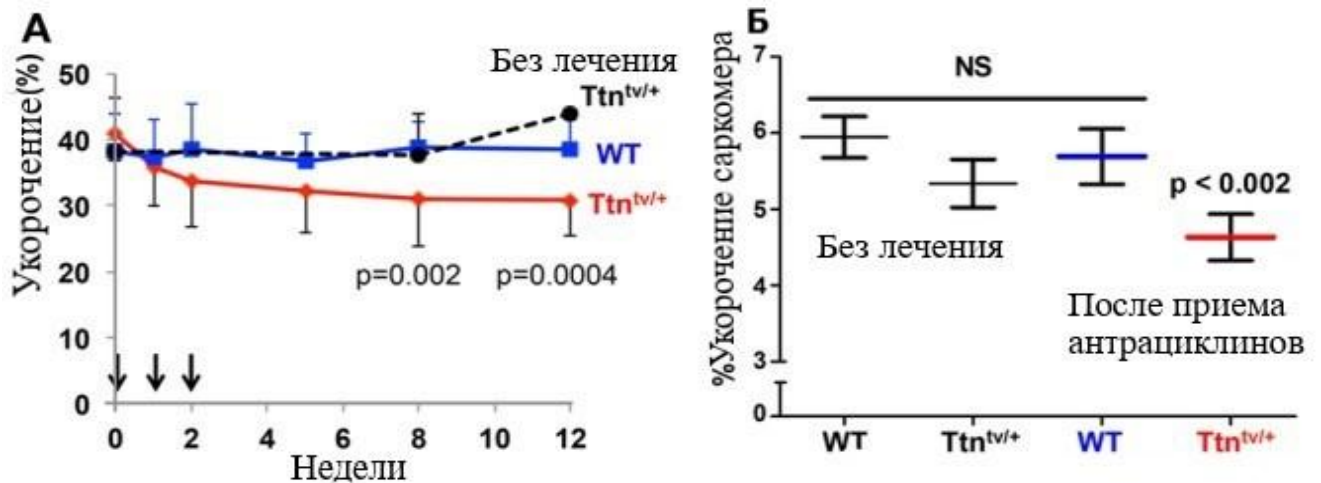


Рисунок 14 – Нарушение функции сердца у мыши с *TTNtv* после лечения антрациклином по сравнению с мышью дикого типа [56]

Примечание: До введения доксорубина интраперитонеально (5мг/кг) мышь с укорачивающим вариантом в гене *TTN* и дикого типа (WT) имели одинаковый уровень функционирования левого желудочка, серия эхокардиограмм после введения трех недельных доз показала существенное подавление систолической функции (для оценки использовалось измерение фракции выброса) (А). Спустя 12 недель после введения доксорубина в изолированных кардиомиоцитах (52 и более на каждую группу) мыши с укорачивающим вариантом в гене *TTN* было зарегистрировано значительное снижение сократимости по сравнению с кардиомиоцитами мышью дикого типа (Б)

Таким образом, были получены подтверждения ассоциации *TTNtv* с развитием кардиомиопатий индуцированных химиотерапией.

1.5.2 Алкогольные кардиомиопатии

Алкогольные кардиомиопатии (АлкКМП) вызываются постоянным и чрезмерным употреблением алкоголя, фенотипически являясь схожими с ДКМП, но при этом обладая более благоприятным прогнозом [44, 56]. Патопфизиология АлкКМП остается до конца неизученной, и четкой связи между уровнем потребляемого алкоголя и тяжестью заболевания не определено [44, 66]. Развитие АлкКМП происходит не у всех, злоупотребляющих алкоголем, что указывает на различия в восприимчивости, основанной на генетических и средовых факторах.

В 2018 году было проведено генетическое исследование пациентов с АлкКМП (n=141), ДКМП (n=716) и контрольной группы здоровых добровольцев (n=445), по результатам которого *TTNtv* были обнаружены у 9.9% пациентов с АлкКМП, 12% – с ДКМП и всего у 0.7% среди контрольной группы [191]. Найденные *TTNtv* располагались в постоянно–экспрессирующихся в сердце экзонах и были распределены по всей длине гена, причем 13 из 14 были впервые обнаруженными [191]. Существенных различий среди пациентов с АлкКМП с *TTNtv* и без них по фенотипическим или демографическим признакам не было [191]. При этом наличие *TTNtv* не влияло на успешность лечения заболевания и продолжительность жизни после начала лечения и снижения употребления алкоголя [191]. Таким образом, мы видим, что наличие укорачивающих вариантов в тайтине увеличивает риск развития АлкКМП, при этом данный эффект в значительной степени ассоциирован с уровнем конститутивности экзона, в котором расположен генетический вариант.

1.5.3 Перипартальная кардиомиопатия

Согласно классификации Ассоциации сердечной недостаточности Европейского кардиологического общества перипартальная КМП определяется как идиопатическая КМП, характеризующаяся сердечной недостаточностью, вторичной по отношению к систолической дисфункции левого желудочка, к концу беременности или в первые месяцы после родов, когда другие причины сердечной недостаточности не обнаружены. Данный диагноз является диагнозом исключения [179]. Американская ассоциация сердца определяет ее как редкую дилатационную приобретенную первичную КМП, ассоциированную с дисфункцией ЛЖ и сердечной недостаточностью [127]. Тяжесть ПКМП крайне вариабельна, начиная от полного восстановления до быстрого развития терминальной стадии сердечной недостаточности. Распространённость ПКМП составляет от 1:300 до 1:1300 случаев беременности, с очагами высокой заболеваемости, таких как Гаити и Нигерия [148,

178]. Согласно недавно проведенным исследованиям, ПКМП может быть начальным проявлением семейной ДКМП [135, 182], доказывая тем самым, по крайней мере в определенном количестве случаев, генетическую предрасположенность к развитию сердечной недостаточности при беременности [181]. При исследовании семей, страдающих данной патологией, патогенные мутации в гене *TTN* были найдены у 16.5%, и еще у 22% были найдены варианты гена, классифицируемые как вероятно патогенные [181]. Все мутации были расположены в А-зоне молекулы, при этом они оказались ассоциированы с развитием ДКМП [80]. В дальнейшем для доказательства патогенности «вероятно патогенных» вариантов гена были проведены функциональные исследования, показавшие снижение пассивной жесткости (1.0 ± 0.3 КН/м²) по сравнению с данными контрольной группы, полученными ранее (~ 2.5 КН/м²) (Рисунок 15) [22, 39]. Анализ соотношения изоформ тайтина показал сдвиг в сторону менее жесткой изоформы N2BA у пациентов с ПКМП ($0,72 \pm 0,02$) по сравнению с данными контрольной группы (0.39 ± 0.05) [25].

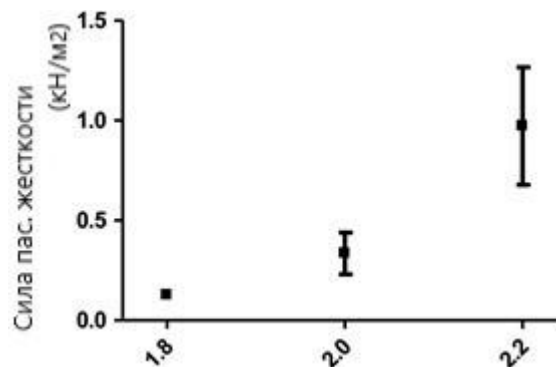


Рисунок 15 – Изменение пассивной жесткости при длине саркомера 1.8, 2.0, и 2.2 мкм [181]

Таким образом, было показано влияние вариантов в гене *TTN* на развитие ПКМП, и подтверждено, что ПКМП может быть ранним проявлением семейной формы ДКМП, ассоциированной с вариантами в гене *TTN* [181].

Исходя из вышеизложенного, можно с уверенностью сказать, что варианты в гене *TTN*, в первую очередь укорачивающие, являются фактором риска для развития приобретенных КМП, что вероятнее всего обуславливается нарушением адаптации кардиомиоцитов к стрессорным воздействиям различных повреждающих агентов, вызывающих нарушение метаболизма и гипоксию клеток. В норме их патологическое воздействие должно компенсироваться работой изменением экспрессии изоформ тайтина посредством альтернативного сплайсинга и фосфорилирования. Изменение структуры белка вследствие возникновения единичных генетических вариантов или укорачивающих вариантов приводит к нарушению работы данных механизмов и способствует развитию сердечно-сосудистой патологии.

1.6 Актуальность исследования укорачивающих вариантов гена *TTN* у пациентов с хронической сердечной недостаточностью, обусловленной приобретенными заболеваниями миокарда

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) – это синдром, развивающийся в результате нарушения способности сердца к наполнению и/или опорожнению, протекающий в условиях нарушения баланса вазоконстрикторных и вазодилатирующих нейрогуморальных систем; сопровождающийся неадекватной перфузией органов и тканей организма и проявляющийся комплексом симптомов: одышкой, слабостью, сердцебиением, повышенной утомляемостью и задержкой жидкости в организме (отечным синдромом) [8]. Согласно данным эпидемиологических исследований распространенность ХСН в РФ составляет 7%, в том числе клинически выраженная – 4,5% [11]. Согласно клиническим рекомендациям Европейского кардиологического общества ХСН подразделяется на три типа в зависимости от уровня фракции выброса (ФВ) ЛЖ: ХСН со сниженной ФВ (менее 40%), ХСН с умеренно низкой ФВ (от 40% до 49%) и ХСН с сохраненной ФВ (50% и более) [21]. ХСН является одной из основных причин госпитализации в

РФ, составляя 16,8% от всех пациентов с сердечно–сосудистыми заболеваниями (ССЗ) [1]. Столь большая распространенность данной патологии, ее тяжесть и дороговизна лечения требуют разработки различных методов профилактики. На сегодняшний день они заключаются в осуществлении контроля факторов риска, таких как лечение ССЗ, борьба с ожирением и сахарным диабетом. Определение патогенных генетических вариантов, обуславливающих развитие ХСН, у пациентов с ССЗ, могло бы инициировать применение профилактических мер до развития значимых клинических проявлений данного осложнения, значительно улучшая качество жизни и прогноз заболевания.

Развитие технологии секвенирования в конце 20 века открыло возможность поиска генетических вариантов, ассоциированных с развитием сердечной недостаточности. В первую очередь внимание исследователей было сосредоточено на генах, кодирующих белки и ферменты ренин–ангиотензин–альдостероновой системы, как основного нейрогуморального механизма, вовлеченного в патогенез развития сердечной недостаточности. В частности, еще в 1993 году Reynolds с соавт. опубликовали данные о связи полиморфизма I/D в гене ангиотензин–превращающего фермента (ACE) с развитием ДКМП и ХСН [160]. Однако мета–анализ семнадцати проведенных исследований данного полиморфизма в гене аденозин–превращающего фермента не подтвердил его связь с развитием сердечной недостаточности [19]. При этом в различных исследованиях было показано, что данный полиморфизм может выступать в качестве модификатора развития ХСН, по крайней мере в популяции белой европеоидной расы. Также были исследованы полиморфизмы в генах, кодирующих такие элементы ренин–ангиотензин–альдостероновой системы как ангиотензиноген, рецептор ангиотензина II, альдостерон–синтаза, альфа– и бета–адренергические рецепторы и эндотелин, однако в подавляющем большинстве исследований найти четкую корреляцию между преобладанием определенного полиморфного варианта и развитием ХСН не удалось [23].

Усовершенствование технологии генетических исследований открыло возможность проведения полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), в результате которых в 2010 году были найдены два локуса вблизи генов *USP3* (rs10519210) и *LRIG3* (rs111721782) для европеоидной и негроидной расы соответственно [180], и два полиморфизма в интронной части генов *HSPB7* (rs1739843) и *FRMD4B* (rs6787362) [32], ассоциированных с развитием сердечной недостаточности. В 2011 году при помощи технологии полногеномного секвенирования были исследованы пациенты (n=1179) с идиопатической формой ДКМП, одним из проявления которой является систолическая сердечная недостаточность, и проведено сравнение с контрольной группой (n=1108), в результате чего было найдено еще два однонуклеотидных полиморфизма (SNP) - rs10927875 в области вышеупомянутого гена *HSPB7* и rs2234962 в гене *BAG3*, ассоциированных с развитием данной патологии [189]. В дальнейшем были найдены еще несколько полиморфизмов в вышеупомянутом гене *HSPB7* (rs10927886), а также в ряде других : rs62232870 downstream *LSM3*, rs7284877 в гене *SMARCB1* [50, 53]. Кроме того, была доказана связь двух генетических вариантов в гене *MADD* (rs10838692 и rs2290149) с развитием систолической ХСН [7]. Объектом дальнейшего поиска генетических детерминант, обуславливающих развитие ХСН, может являться ген тайтина вследствие своей полиморфности, функциональной значимости и множества функций в структуре саркомера, особенно учитывая, что в 2018 году была доказана связь патогенных вариантов в гене *TTN* с ранним развитием (до 66 лет) фибрилляции предсердий (ФП) [174].

Исходя из вышеизложенного, очевидно, что тайтин выполняет множество важнейших функций в миогенных клетках сердечно-сосудистой и мышечной системы, а его генетические варианты вызывают развитие или отягощают клиническое течение различных сердечно-сосудистых заболеваний. Поскольку молекула тайтина способна изменять жесткость путем фосфорилирования и изменения соотношения изоформ при патологических процессах, тайтин может

влиять на течение приобретенных заболеваний миокарда, в частности, на постинфарктное ремоделирование миокарда и течение ХСН, а различные варианты в данном гене могут модулировать данные процессы.

В данной работе нами изучался вклад вариантов в гене *TTN* и гене *RBM20* в развитие и течение сердечно–сосудистой патологии: определена частота и спектр как укорачивающих, так и однонуклеотидных генетических вариантов в различных группах пациентов а также в условно–здоровой группе жителей Санкт-Петербурга; проведена оценка распределения вариантов в структуре транскрипта гена тайтина в данных группах и проведено сравнение с результатами международных исследований; произведена оценка влияния наиболее распространенных полиморфизмов в гене *RBM20* на развитие фибрилляции предсердий. Ранее на территории Российской Федерации исследований подобного рода не проводилось, соответственно не существует данных по распространению вариантов гена тайтина в популяции, тем более что не проведена оценка патогенности различных вариантов. Стоит заметить, что сложность интерпретации данных вариантов заключается в их высокой распространенности среди здоровых людей, составляющей от 1 % до 3% [78, 123, 192].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

В качестве контрольной группы в работу были включены условно-здоровые мужчины (n=192) из числа жителей Санкт-Петербурга ранее обследованные в рамках исследования ЭССЕ–РФ [3] в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет, русские по национальности. Обследование пациентов данной группы включало анкетирование, регистрацию ЭКГ, антропометрию, измерение артериального давления и пульса, забор крови натощак с определением липидного спектра, глюкозы, мочевой кислоты и креатинина в центральной лаборатории Национального медицинского исследовательского центра им. В. А. Алмазова. Каждый пациент заполнял стандартный вопросник, который позволял охарактеризовать социально-демографическое положение обследуемого, общее состояние здоровья и отношение к своему здоровью, наличие факта курения, употребления алкоголя, особенности питания. ЭхоКГ данной группе пациентов не выполнялась. Данная группа условно-здоровых мужчин – жителей Санкт-Петербурга и использовалась в качестве контрольной группы и группы сравнения для определения спектра и частот генетических вариантов в генах *TTN* и *RBM20*.

В исследуемую группу пациентов с КМП (n=251) вошли пациенты с различными типами данной патологии, в том числе с РКМП (n=80), ДКМП (n=66), ГКМП (n=50), АКМП (n=23) и НМ (n=33). Диагноз КМП был установлен с учетом общепринятых международных критериев соответствующего типа КМП, таких как модифицированные International Task Force и Падуанские критерии для АКМП [4] или МРТ-критерии Петерсена для НМЛЖ [152], критериев ГКМП Российского кардиологического общества [6], критериев ДКМП британского общества эхокардиографии [129]. Больше половины пациентов данной группы (57%) составили лица мужского пола (142 пациента). Кроме того, 105 человек являлись пациентами с дебютом заболевания в детском возрасте (от 0 до 18 лет). Включение

пациентов в данную группу определялось наличием выполненного ранее генетического исследования методом высокопроцессивного секвенирования с использованием целевой панели, включающей 172 гена (Приложение 1), в том числе *TTN* и *RBM20*. У большинства пациентов с КМП были обнаружены причинные патогенные и вероятно патогенные варианты. Обнаруженные варианты располагались в генах, кодирующих белки, ответственные за формирование различных клеточных структур и процессов: цитоскелета и наружной клеточной мембраны (*ALPK3, BAG3, DES, DMD, FLNA, FLNC, LAMA4, MYOF, MYPN*), межклеточных контактов (*JUP, PKP2, VCL*), саркомера (*MYBPC3, MYH6, MYH7, TNNT3, TNNT2*), сигнальных путей (*BRAF, NF1, PTPN11, RAF1, SHOC2, SOS1, TSC2*), ионных каналов (*ABCC9, AKAP9, CACNA1C, CACNB2, DMPK, HCN4, KCNH2, KCNQ1, RYR2, SCN10A, SCN5A, TRPM4*).

В исследуемую группу пациентов с ХСН (n=494) были включены мужчины в возрасте $57,4 \pm 7,4$ лет, перенесшие инфаркт миокарда. Исследуемая группа была разделена на подгруппы в зависимости от уровня снижения ФВ ЛЖ. В первую подгруппу вошли пациенты с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией (ХСНнФВ) I–IV функционального класса (ФК) с ФВ ЛЖ (Simpson) $\leq 40\%$ (260 пациентов). Вторая подгруппа включала пациентов с хронической сердечной недостаточностью с умеренно низкой фракцией выброса I–IV ФК (ФВ от 41% до 49%) (n=142). В третью подгруппу вошли пациенты с ФВ ЛЖ более 50% с ХСНсФВ I–III ФК (n=50, 54%) и 46% (n=42) пациентов доклинической стадии сердечной недостаточности без симптомов и признаков синдрома. Наличие ишемической болезни сердца (ИБС) подтверждалось с помощью коронарографии.

Учитывая гендерные особенности факторов риска развития ИБС, возрастные и половые различия по формированию фенотипа сердечной недостаточности (СН) 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 данном гене между мужчинами и женщинами нет.

2.2 Инструментально–лабораторные методы исследования

2.2.1. Выделение дезоксирибонуклеиновой кислоты

В качестве источника дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовалась венозная кровь пациентов, взятая в пробирку с этилендиаминтетрауксусной кислотой. Для выделения ДНК из каждого образца забиралось по 350 мкл цельной крови после предварительного перемешивания.

Для выделения ДНК использовался коммерческий набор FlexiGene DNA Kit (Catalog no.51206), в ходе выделения ДНК применяются 100% изопропанол для осаждения, и 70% этанол для конечной очистки ДНК.

Для оценки концентрации и чистоты выделенной ДНК использовался спектрофотометр NanoDrop 1000 ThermoScientific (Рисунок 16).

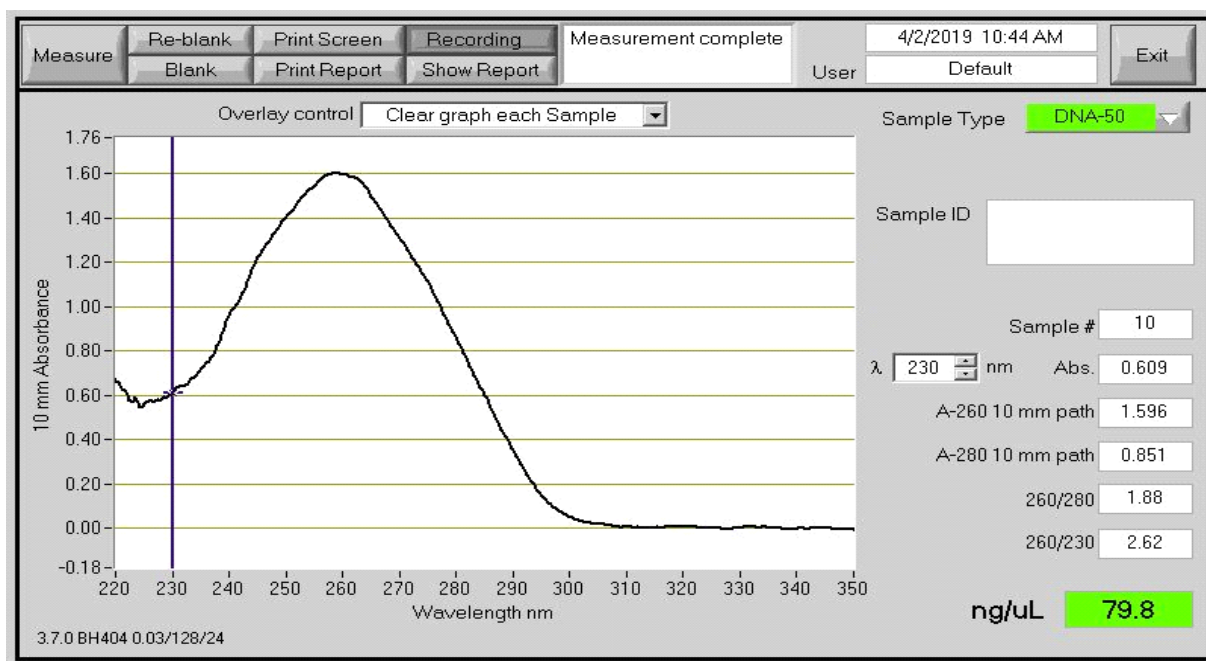


Рисунок 16 – Измерение концентрации дезоксирибонуклеиновой кислоты и оценка ее чистоты

В качестве калибратора использовался буфер FG3, в котором растворялась ДНК. Как видно из приведенного выше изображения, помимо концентрации спектрофотометр также отображает степень загрязнения ДНК. Для оценки загрязнения отображаются показатели 260/280 и 260/230. Целевым считался показатель 260/280 равный примерно 1.8, показатель существенно ниже указывал на загрязненность белками, фенолом и другими веществами, спектр поглощения которых находится в районе 280нм.

2.2.2 Секвенирование по Сэнгеру

Для подтверждения полученных причинных генетических вариантов было использовано полуавтоматическое секвенирование по Сэнгеру на основе капиллярного электрофореза. Для получения искомым фрагментов проводилась полимеразная цепная реакция (ПЦР) с праймерами к экзонам генов *TTN* и *RBM20* производства компании ООО "Люмипроб РУС", Россия. Реакция ПЦР проводилась в приборе Applied Biosystems Veriti, США.

На проведения одной реакции объемом 25 мкл использовалось:

- 5 мкл буфера 5x Green GoTaq (Promega, США)
- 2 мкл смеси дезоксинуклеотидов (dNTP)
- 4 мкл праймеров с концентрацией 10 пМ/мкл
- 1 мкл геномной ДНК пациента
- 0,3 мкл Taq-полимеразы (ООО «Биосан», Россия)
- 12,7 мкл сверхчистой воды (miliQ)

Используемая программа для проведения ПЦР:

1. 95°C – 5 минут
2. 95°C – 1 минута
3. 60°C – 1 минута
4. 72°C – 1 минута 30 секунд
5. Переход на шаг 2 и повторение 35 циклов

6. 72°C – 10 минут

В дальнейшем для удаления реакционных компонентов смеси был использован электрофорез в 1,5% агарозном геле, и очистка полученных бэндов от агарозы с использованием силикатных частиц и раствора йодида натрия. Далее была произведена постановка ПЦР с использованием терминирующих нуклеотидов для получения образцов ДНК различной длины с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Catalog no.4337455) Applied Biosystems, США.

На проведения одной реакции объемом 10 мкл использовалось:

- 3,4 мкл воды
- 2 мкл буфера BigDye Terminator 5X Sequencing Buffer
- 1 мкл BigDye Terminator Ready Reaction Mix
- 1,6 мкл праймера
- 2 мкл ДНК целевого экзона

Используемая программа для проведения ПЦР:

1. 95°C – 1 минута
2. 95°C – 10 секунд
3. 50°C – 5 секунд
4. 60°C – 4 минуты
5. Переход на шаг 2 и повторение 25 циклов

На последнем этапе производилась очистка полученной ДНК от компонентов реакционной смеси при помощи этанола и этилендиаминтетрауксусной кислоты. Полученные образцы ДНК были растворены в 10 мкл формамида и загружены в секвенатор Applied Biosystems 3500 Genetic analyzer.

2.2.3 Ультразвуковая обработка дезоксирибонуклеиновой кислоты

Для ультразвуковой обработки выделенной ДНК была использована ультразвуковая система Bioruptor компании Diagenode. Для приготовления библиотек были получены образцы ДНК размером 150 пар оснований (п.о.). Для

этого, в соответствии с протоколом, образцы выделенной ДНК были разведены до концентрации 5 нг/мкл и обработаны ультразвуком в течение 70 циклов, каждый из которых состоял двух фаз («On/Off») по 30 секунд каждая. Через каждые 10 циклов для равномерной обработки ДНК производилось перемешивание и центрифугирование образцов. По окончании ультразвуковой обработки осуществлялся контроль качества полученной ДНК измерением ее концентрации и постановки электрофореза для оценки длины полученных фрагментов (Рисунок 17).

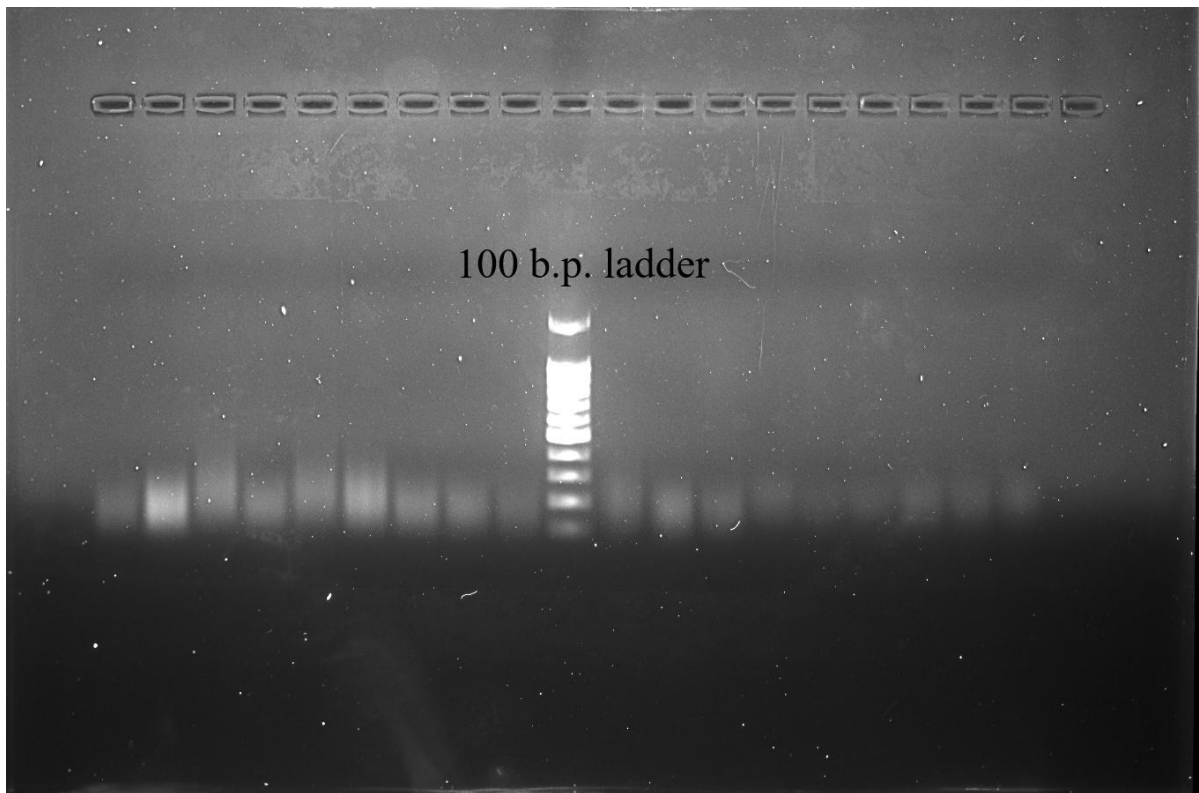


Рисунок 17 – Электрофорез дезоксирибонуклеиновой кислоты после ультразвуковой обработки

Примечание: 100 b.p. ladder – маркер длин дезоксирибонуклеиновой кислоты 100+ пар нуклеотидов

2.2.4 Подготовка библиотек для секвенирования нового поколения

Подготовка библиотек состоит из трех этапов:

1. Подготовка образцов

2. Гибридизация и прикрепление образцов к покрытым стрептавидином магнитным частицам
3. Индексирование и подготовка образцов для мультиплекного секвенирования.
1. Подготовка образцов

На предварительном этапе производится оценка концентрации и длины ДНК при помощи капиллярного электрофореза высокого разрешения с использованием аппарата Bioanalyzer 2100, максимальный уровень пика должен находиться на уровне 150 п.о. (Рисунок 18).

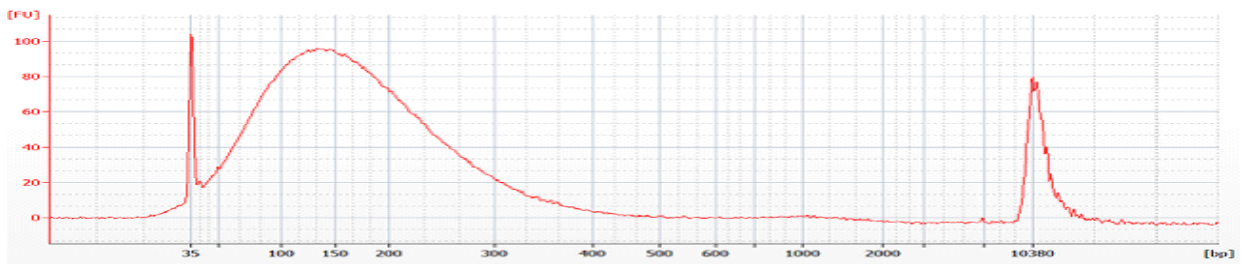


Рисунок 18 – Оценка качества дезоксирибонуклеиновой кислоты на аппарате Bioanalyzer 2100 после ультразвуковой обработки

Далее необходимо провести восстановление концов ДНК-образцов при помощи T4 и Klenow ДНК-полимераз и T4 полинуклеотидной киназы. Следующим этапом является очистка образцов ДНК с помощью магнитных частиц AMPure XP. Затем происходит прикрепление полиА-хвоста к 3`концу и концевых адапторов. Далее производится амплификация полученной адаптор-лигированной библиотеки. После каждого из этапов производится очистка образцов ДНК с помощью магнитных частиц AMPure XP от остатков реакционной смеси.

В конце данного этапа проводится оценка концентрации и длины полученных библиотек при помощи капиллярного электрофореза высокого разрешения на аппарате Bioanalyzer 2100, максимальный уровень пика должен находиться в диапазоне от 225 до 275 п.о. (Рисунок 19).

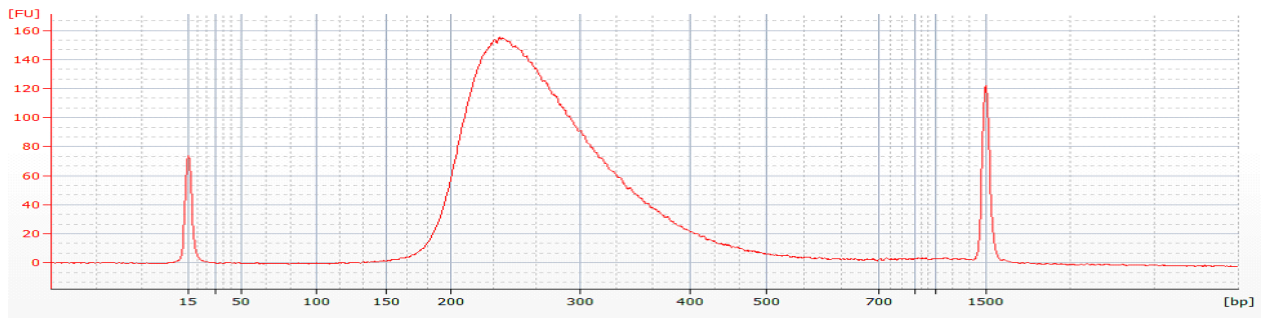


Рисунок 19 – Оценка качества библиотек на аппарате Bioanalyzer 2100 после прикрепления dA-хвоста к 3`концу и концевых адапторов

2. Гибридизация и прикрепление образцов к покрытым стрептавидином магнитным частицам

Параллельно необходимо осуществлять два процесса: гибридизацию образцов в библиотеку и приготовление покрытых стрептавидином магнитных частиц. Далее осуществляется захват гибридизованной ДНК магнитными частицами и отмывка шариков с помощью двух промывочных буферов.

3. Индексирование и подготовка образцов для высокопроцессивного секвенирования.

Последним этапом в приготовлении библиотек является прикрепление уникальных последовательностей (индексов) к полученным образцам с помощью амплификации. Далее происходит очистка образцов с помощью магнитных частиц AMPure XP и оценка концентрации и длины индексированных библиотек (максимальный уровень пика должен быть в диапазоне от 250 до 350 п.о.), концентрация определяется с помощью интеграла (Рисунок 20).

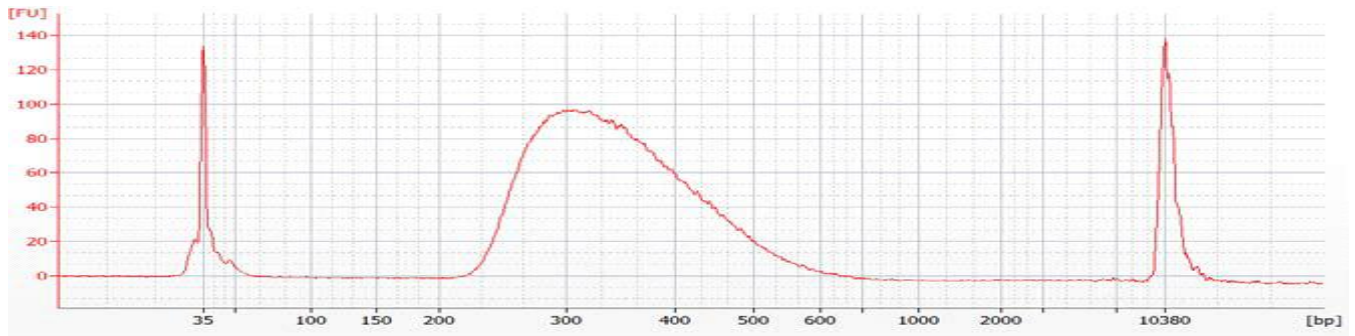


Рисунок 20 – Оценка качества библиотек на аппарате Bioanalyzer 2100 после присоединения индексов

В зависимости от полученной концентрации необходимо рассчитать объем раствора индекса, который необходимо добавить по следующей формуле:

$$\text{Volume of Index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)} \quad (1)$$

Где:

$V(f)$ – окончательный объем

$C(f)$ – окончательная концентрация

$\#$ – число индексов

$C(i)$ – начальная концентрация индексируемого образца

Перед загрузкой образцов необходимо отрегулировать окончательный объем относительно запланированной концентрации (добавить буфер TE, если он меньше/лиофилизировать и восстановить объем, если он больше)

2.2.5 Секвенирование нового поколения

Для создания зондов был использован сервис Agilent Sure Design. Было создано четыре группы зондов для экзонов генов *TTN*, *RBM20* из них три – для гена тайтина. Общее количество зондов составило 7840 штук, общая длина покрытия – 212,742

тысяч пар оснований. Для генов *TTN* и *RBM20* было создано 208 целевых интервалов. Целевые интервалы захватывали все экзоны, а также по 5-8 нуклеотидов с каждой стороны экзона для поиска вариантов в сайтах сплайсинга. Секвенирование было выполнено с использованием прибора Illumina MiSeq с использованием набора для запуска MiSeq Reagent Kit v3 (150 cycle) (Catalog no. MS-102-3001). Генетические варианты учитывались при количестве прочтений не менее десяти. Анализ данных секвенирования следующего поколения осуществлялся с использованием cutadapt v.3.0, bwa v.0.7.17, Picard v.2.25.0 and Genome Analysis ToolKit (GATK – биоинформатическая программа для анализа результатов секвенирования) v.4.2.0.0 на основании рекомендаций разработчиков GATK (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) для идентификации коротких герминальных вариантов. HaplotypeCaller в когортном режиме использовался для генотипирования индивидуальных GVCF файлов. Фильтрация полученных вариантов проводилась с использованием параметров, рекомендованных GATK. Клиническая интерпретация вариантов осуществлялась согласно классификации ACMG с использованием международных баз данных gnomAD exomes, UniProt Variants и ClinVar. Информация о частоте варианта была взята из базы данных gnomAD Genomes version 3.1.1. Варианты с частотой более 0,1% исключались, так как они не могут выступать в качестве причинных вариантов заболевания. Найденные генетические варианты были подтверждены при помощи полуавтоматического секвенирования по Сэнгеру при помощи прибора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer.

2.3 Методы статистической обработки результатов

Статистическую обработку проводили с помощью пакета Statistica 10. Для подсчета разницы аллельных вариантов между группами пациентов был использован критерий соответствия Пирсона – χ^2 . Если в некоторых ячейках таблицы

сопряженности ожидаемая частота была менее 5, то использовался точный критерий Фишера. Достоверным считалось значение p менее 0,05. Для выражения значимости выявленных ассоциаций между клинической картиной заболевания и аллельными вариантами были использованы значения отношения рисков (ОР) и его 95% доверительный интервал (ДИ). Сравнение между собой непрерывных величин с нормальным распределением осуществляли с помощью t -теста. Для оценки PSI экзонов, содержащих генетические варианты был использован ресурс https://www.cardiodb.org/titin/titin_transcripts.php.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Для поиска генетических вариантов было проведено высокопроцессивное секвенирование при помощи технологии Illumina MiSeq. Для подтверждения найденных патогенных и укорачивающих вариантов было проведено полуавтоматическое секвенирование по Сэнгеру. Однонуклеотидных варианты с частотой более 0,1% были исключены из дальнейшего анализа, потому что в гетерозиготном состоянии они не описаны в качестве причиной сердечно-сосудистой или любой другой патологии. *TTN*_{tv}, варианты в сайтах сплайсинга, а также инсерции и делеции без сдвига рамки считывания (NF ins/del) с частотой более 5% также были исключены из анализа по аналогичной причине. Для оценки частоты встречаемости генетических вариантов на первом этапе было проведено генетическое исследование контрольной группы, так как необходимые данные по группе жителей Санкт-Петербурга отсутствуют, при этом частота *TTN*_{tv} согласно ранее опубликованным зарубежным данным составляет от 1 % до 3% в популяции. В качестве контрольной группы были обследованы 192 человека условно-здоровых мужчины – жителя Санкт-Петербурга в возрасте $55,8 \pm 6,6$ лет, русские по национальности.

В результате проведения секвенирования нового поколения в контрольной группе (n=192) всего было выявлено 2002 однонуклеотидных 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 NF ins/del, 18 из них имели частоту встречаемости менее 5% (Таблица 2). Частота *TTN*_{tv} в условно-здоровой контрольной группе таким образом составила 2,6%, что соответствует данным международных исследований

[16]. 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>TTNtv</i>		5 (2,6%)	5 (2,6%)
<i>Из них</i>	Делеция/инсерция со сдвигом рамки считывания	5 (2,6%)	5 (2,6%)
<i>Из них</i>	Нонсенс варианты	0	0
Вариантов в сайте сплайсинга		69 (36%)	8 (4,2%)
<i>Из них</i>	Замена в сайте сплайсинга	68 (35%)	7 (3,6%)
<i>Из них</i>	Инсерция в сплайс–сайте	1 (0,5%)	1 (0,5%)
Делеция/инсерция без сдвига рамки считывания		5 (2,6%)	5 (2,6%)
Итого		79	18
Примечание: <i>TTNtv</i> – 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 ACMG принадлежало к группе вариантов неопределенной значимости или вероятно доброкачественных (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 и вероятно патогенные	0 (0%)
Неопределенной значимости	3 (10,3%)
Вероятно доброкачественные	23 (79,4%)
Доброкачественные	3 (10,3%)

Далее была произведена оценка PSI экзонов, содержащих однонуклеотидных варианты, а затем проанализирована патогенность данных вариантов при помощи различных шкал на основе нейронных сетей, таких как Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED (Таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика патогенности однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* в условно-здоровой группе жителей Санкт-Петербурга по шкалам Mutation Taster, SIFT, PolyPhen, CADD PHRED, ACMG

Однонуклеотидный вариант	PSI	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen	CADD PHRED	ACMG
NM_001267550.2:c. A26807G	62	Disease causing, Polymorphism (0,5876)	Tolerated (0,04277)	benign (0)	5,272	LB
rs776154251	54	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2068)	benign (0.003)	21,3	LB
rs1001215658	100	No data	No data	benign	14,45	VUS

				(0.012)		
rs368321767	100	Disease causing (0,4195)	Tolerated (0,3325)	benign (0.018)	19,72	LB
rs72650034	10	Polymorphism (0,08975)	Tolerated (0,3138)	benign (0.055)	7,632	LB
rs202098308	100	Disease causing (0,4189)	Tolerated (0,2556)	benign (0,146)	16,44	LB
rs55945684	100	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0,183)	22,6	LB
rs55945684	100	Disease causing (0,4569)	Damaging (0,4819)	benign (0,183)	22,6	LB
rs147314430	1	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Damaging (0,4371)	benign (0.23)	10,91	B
NM_001267550.2: c.T105994G	100	Disease causing (0,4457)	Tolerated (0,3554)	benign (0.322)	23,1	LB
rs199501185	100	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,5646)	possibly: damaging (0.607)	24	LB
rs879099986	32	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,08335)	possibly: damaging (0.696)	23,4	LB
rs183482849	56	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,2031)	possibly: damaging (0.703)	15,45	LB
rs776534823	100	Disease causing, Polymorphism (0,3858)	Tolerated (0,2107)	possibly: damaging (0.777)	23,6	LB
rs72648940	6	Disease causing (0,81)	Damaging (0,6542)	possibly: damaging (0.877)	24,2	LB

rs72648206	100	Disease causing (0,4483)	Damaging (0,4504)	probably: damaging (0.917)	24,1	LB
rs372304158	100	Disease causing (0,548)	Tolerated (0,3712)	probably: damaging (0.93)	25,7	LB
rs1403788853	100	Disease causing (0,5293)	Damaging (0,5993)	probably: damaging (0.942)	24,2	LB
rs185921345	100	Disease causing (0,4283)	Damaging (0,7849)	probably: damaging (0.953)	24,3	B
rs201394117	26	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated (0,1018)	probably: damaging (0.966)	23,8	LB
rs367774903	100	Disease causing (0,5876)	Damaging (0,9125)	probably: damaging (0.982)	25,8	LB
NM_001267550.2: c.C49654G	100	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably: damaging (0.997)	23,7	VUS
rs370137295	100	Disease causing (0,5876)	Tolerated, Damaging (0,4278)	probably: damaging (0.998)	24	LB
rs191549948	100	Disease causing (0,81)	Damaging (0,9125)	probably: damaging (0.998)	26,3	LB
rs1414717534	100	Disease causing (0,81)	Damaging (0,5013)	probably: damaging (1)	16,06	VUS
rs374394719	5	Polymorphism (0,08975)	Tolerated(0 ,1015)	unknown (0)	0,006	LB

rs371580084	1	Polymorphism (0,2615)	Нет данных	unknown (0)	4,677	LB
NM_001267550.2: c.A13112C	7	Disease causing, Polymorphism (0,81)	Tolerated, Damaging(0,9125)	unknown (0)	12,34	LB
rs78535378	4	Polymorphism (0,2305)	Tolerated (0,05061)	unknown (0)	11,81	B
Примечание: VUS – вариант неопределенной значимости, LB – вероятно-доброкачественный вариант, B – доброкачественный вариант.						

Таким образом, частота однонуклеотидных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в условно-здоровой группе жителей Санкт-Петербурга составила 15,1% (29 из 31) и 1% (2 из 31) 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 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 тип III, 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 $40,6 \pm 54,2\%$. (Таблица 5).

Таблица 5 – Список укорачивающих вариантов в гене *TTN*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерции и делеции без сдвига рамки считывания в контрольной группе с указанием процента сплайсинга соответствующих экзонов

Позиция	Тип варианта	PSI, %	ACMG
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2: c.19326del	делеция со сдвигом рамки считывания	4	P
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2: c.98566del	делеция со сдвигом рамки считывания	100	LP
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2: c.85278del	делеция со сдвигом рамки считывания	100	P
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2: c.40459del	делеция со сдвигом рамки считывания	3	LP
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2: c.34775del	делеция со сдвигом рамки считывания	54	LP
5x <i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.67635T>C	вариант в сайте сплайсинга	100	B
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.52705+2T>A;-	вариант в сайте сплайсинга	100	P
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.1937A>G	вариант в сайте сплайсинга	96	LP
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.3100G>A	вариант в сайте сплайсинга	100	U
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.105514_105516del	делеция без сдвига рамки считывания	100	U
<i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.74600_74602del	делеция без сдвига рамки считывания	100	U
3x <i>TTN</i> ; NM_001267550.2:c.33513_33515dup	дупликация со сдвигом рамки считывания	1	B

Примечание: PSI – индекс процента сплайсинга, ACMG – классификация Американского колледжа медицинской генетики и геномики, P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, U – вариант неопределенной значимости, B – доброкачественный вариант.

3.1.1. Распределение вариантов в доменной структуре тайтина в группе жителей Санкт-Петербурга

Также стоит отметить, что по большинству *TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеций без сдвига рамки считывания нет информации по частоте встречаемости в международных базах данных, так как они не встречались ранее и являются впервые описанными. 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 21).

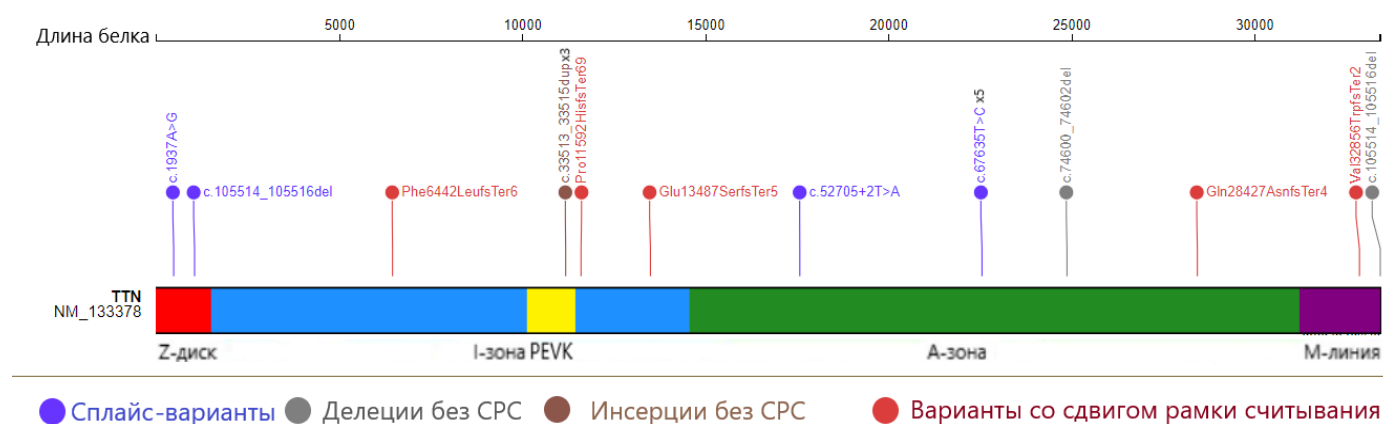


Рисунок 21 – Распределение укорачивающих вариантов, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеции без сдвига рамки считывания по структуре транскрипта гена *TTN* в контрольной группе

Далее была проведена оценка распределения вышеуказанных вариантов по структуре транскрипта гена тайтина и проведено сравнение с данными международных исследований (Рисунок 22). Как и в международных исследованиях, найденные варианты были равномерно распределены по структуре транскрипта.

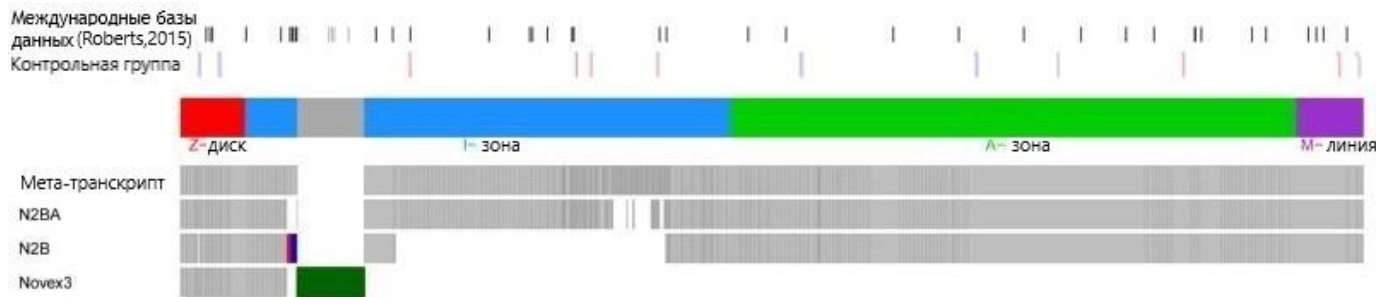


Рисунок 22 – Сравнение распределения генетических вариантов по структуре транскрипта гена тайтина в контрольной группе с данными международных исследований [164]

Примечание: в верхней строчке указаны локализации укорачивающих вариантов относительно структуры гена тайтина в популяции по данным зарубежного исследования, ниже – результаты нашего исследования контрольной группы

Распределение однонуклеотидных вариантов по структуре молекулы тайтина также было равномерным, и таким образом, полностью соответствует ранее опубликованным в международной литературе данным [164]. При этом стоит отметить относительно малое количество однонуклеотидных вариантов в А–зоне (5), которые, как правило, являются более патогенными по сравнению с вариантами в других участках молекулы тайтина. Также обращает внимание относительно большое число вариантов в I–зоне (14), экзоны в которой имеют относительно низкий уровень PSI (Рисунок 23).



Рисунок 23 – Распределение однонуклеотидных вариантов в контрольной группе (с частотой менее 0,1%) по доменной структуре гена тайтина

Таким образом, при генетическом исследовании условно–здоровой группе жителей Санкт-Петербурга были определены частота и спектр генетических вариантов в генах *TTN* и *RBM20*. Нами было показано, что частота однонуклеотидных вариантов (с частотой встречаемости 0,1% и менее) в условно–здоровой группе 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 [15]. Частота *TTN*tv и вариантов в сайтах сплайсинга с частотой минорного аллеля (MAF – minor allele frequency) менее 5% в исследованной нами контрольной группе составила 2,6% и 4,2%, соответственно. При этом среди них отсутствовали патогенные и вероятно патогенные варианты. Все выявленные *TTN*tv и варианты в сайтах сплайсинга были распределены равномерно в доменной структуре белка тайтина.

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

На следующем этапе исследования нами была поставлена задача оценить вклад редких вариантов 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 НМЛЖ (n=30). Из 251 пациента данной группы 105 были детского возраста (от 0 до 18 лет). Для поиска причинных вариантов пациентам данной группы было проведено высокопроцессивное секвенирование с использованием панели генов, созданной при помощи SureDesign (Agilent, США), ассоциированных с развитием КМП (n=172) (Приложение 1), включающей в том числе гены *TTN* и *RBM20*. Наиболее часто патогенные варианты были найдены в таких генах как *MYH7*, *MYBPC3*, *SCN5A*,

LMNA, *TNNI3*, *RYR2*, *TNNT2*, *DYS* и многих других. Анализ данных причинных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов и их связь с клиническим течением заболевания проводилась вне рамок данного диссертационного исследования. Клиническая и генетическая характеристика пациентов представлена в Таблице 6.

Таблица 6 – Клиническая и генетическая характеристика группы пациентов с кардиомиопатиями

Тип КМП	Пол (муж./жен.)	Возраст (дети/взр.)	Трансплантация сердца (есть/нет)	Семейный/ несемейный случай
ДКМП (n=63)	36/27	23/40	1/62 (1,6%)	7/56 (11,1%)
ГКМП (n=53)	25/28	17/36	1/52 (1,9%)	6/47 (11,3%)
РКМП (n=72)	32/40	34/38	5/67 (7%)	7/65 (9,7%)
АКМП (n=33)	18/15	8/25	3/30 (9%)	6/27 (18,2%)
НМЛЖ (n=30)	22/8	23/7	2/28 (6,7%)	2/28 (6,7%)
Примечание: ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, АКМП – аритмогенная кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка.				

В данной работе нами был проведен анализ вариантов в генах *TTN* и *RBM20*, которые рассматривались либо в качестве основных и причинных в отношении развития КМП, либо полиморфных и редких вариантов в генах *TTN* и *RBM20*, которые являлись фоновыми с учетом их частоты и могли рассматриваться в качестве модулирующих течение основного заболевания.

3.2.1 Варианты в генах *TTN* и *RBM20* в группе пациентов с различными типами кардиомиопатий

При проведении целевого секвенирования ДНК пациентов с различными типами КМП (n=251), в том числе ДКМП (n=63), ГКМП (n=53), РКМП (n=72),

АКМП (n=33) и НМ (n=30) 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 (Таблица 7). Наибольшее количество вариантов было обнаружено у пациентов с ДКМП (n=13 (9 вариантов в *TTN* (14,3%) и 4 в *RBM20* (6,3%)). Среди пациентов остальных групп наблюдалась сходная частота вариантов в *TTN* и *RBM20* (РКМП – n=6 (8,3%), АКМП – (n=2 (2 варианта в гене *TTN* (6,1%) и 1 в гене *RBM20* (3%)) и НМ – n=2 (6,7%)). В группе пациентов с ГКМП было обнаружен только два вероятно-патогенных варианта в гене *TTN*. Кроме того, у ряда пациентов наблюдалось сочетание нескольких причинных вариантов в гене *TTN*. Так например у пациента Л., страдающим ДКМП, было обнаружено два укорачивающих варианта (chr2:179485541,NM_003319:c.18601delA и chr2:179632509, NM_001267550.2:c.C9448T:p.Arg3150Ter), у пациента Ш. – два нонсенс варианта (chr2:179560955, NM_001267550.2:c.A30844T:p.Lys10282Ter и chr2:179398781, NM_003319:c.C75366A:p.Tyr25122 Ter), у пациента П. – два нонсенс варианта (chr2:179398102, NM_003319:c.G76045T:p.Glu25349Ter и chr2:179479676, NM_003319:c.G21463T:p.Glu7155Ter). Стоит отметить, что во всех трех случаях минимум один из них не имел высокого значения процента сплайсинга, выступая скорее в качестве модификатора клинического течения КМП, а не его первопричины. Распределение причинных вариантов среди пациентов с различными типами КМП, а также их сочетание с вариантами в других генах представлено в Таблице 8. Обращает на себя внимание относительно высокий уровень частоты причинных вариантов у пациентов с ДКМП и НМ (13%), а также наличие у большинства данных пациентов причинных вариантов в других генах

Таблица 7 – Список причинных вариантов в группе пациентов с кардиомиопатиями

№/ Параметр	Ген	Тип варианта	Позиция GRCh37	rs	MAF %	PSI , %	ACMG	Тип КМП	ДВ
1	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_003319:c.9172_9173del	-	-	100	P	РКМП	<i>CACNA1C</i>
2	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_003319:c.18601delA	-	-	34	LP	ДКМП	<i>TNNI3</i>
2	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_001267550.2:c.C9448 T: p.Arg3150Ter	rs146572907	0,008	100	P	ДКМП	<i>TNNI3</i>
3	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_001267550.2:c.C1075 78T: p.Gln35860Ter	rs1009131948	0,008	100	P	НМЛЖ	<i>MYOF</i>
4	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_003319:c.G76045T: p.Glu25349Ter	-	-	7	P	РКМП	-
4	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_003319:c.G21463T: p.Glu7155Ter	-	-	4	P	РКМП	-
5	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_001267550.2:c. c.A30844T: p. Lys10282Ter	-	-	100	LP	ДКМП	<i>MYH7</i>

5	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_003319:c.C75366A: p.Tyr25122Ter	-	-	7	LP	ДКМП	<i>MYH7</i>
6	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_133378:c.G5557T: p.Glu1853Ter	rs778377360	0,004	100	VUS	ДКМП	-
7	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_133437:c.G4681T: p.Glu1561Ter	-	-	100	P	РКМП	-
8	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_003319:c.T48213G: p.Tyr16071Ter	-	-	10	P	АКМП	<i>AKAP9</i>
9	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_003319:c.T17997A: p.Tyr5999Ter	-	-	26	LP	НМЛЖ	<i>MYH7,</i> <i>NF1</i>
10	<i>TTN</i>	сплайсинг	NM_001267550:c.92153- 2A>C	-	-	100	LP	РКМП	<i>MYH7</i>
11	<i>TTN</i>	миссенс	NM_003319:c.G60812T: p.Cys20271Phe	-	-	2	LP	АКМП	<i>SCN5A</i>
12	<i>TTN</i>	миссенс	NM_133378:c.C11156A: p.Thr3719Lys	-	-	100	LP	РКМП	<i>KCNQ1</i>
13	<i>TTN</i>	делеция со СРС	NM_001256850.1: c.69185_69186delCA	-	-	100	LP	ГКМП	<i>MYH7</i>
14	<i>TTN</i>	инсерция со СРС	NM_001267550.2: c.65557_65558insAGGTT CA	-	-	100	LP	ДКМП	<i>SPEG</i>

15	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_001267550.2: c.84559_84560del	-	-	100	LP	ДКМП	<i>TNNT2</i>
16	<i>TTN</i>	миссенс	NM_001267550.2:c.C6695 8T: p.Arg22320Cys	rs772361876	0,002	1	LP	ДКМП	<i>NEXN</i>
17	<i>TTN</i>	вариант в сайте сплайсинга	NM_133378:c.11204- 1G>A	-	-	7	LP	НМЛЖ	<i>MYO1I</i>
18	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_133379.5:c.13748_13 751del	rs1460696675	0,001	1	LP	ГКМП	-
19	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_001256850.1:c.80717 _80729del	rs762286447	0,0008	100	P	НМЛЖ	-
20	<i>TTN</i>	делеция со CPC	NM_001256850.1:c.80717 _80729del	rs762286447	0,0008	100	P	НМЛЖ	-
21	<i>TTN</i>	нонсенс	NM_133379.5:c.14539del	rs753092616	0,005	1	LP	ДКМП	<i>DSC2</i>
22	<i>RBM2</i> 0	миссенс	NM_001134363.3:c.C1913 A: p.Pro638Gln	rs267607003	-	-	P	ДКМП	<i>SCN5A</i>
23	<i>RBM2</i> 0	миссенс	NM001134363:c.A2347G: p.Arg783Gly	rs1287523613	-	-	VUS	АКМП	<i>VCL</i>
24	<i>RBM2</i> 0	миссенс	NM_001134363:c.C113G: p.Pro38Arg	-	-	-	VUS	ДКМП	-
25	<i>RBM2</i> 0	миссенс	NM_001134363.3:c.G2737 A:	rs397516607	-	-	LP	ДКМП	-

			p.Glu913Lys						
26	<i>RBM2</i> <i>0</i>	миссенс	NM_001134363.3:c.A1141 G: p.Arg381Gly	-	-	-	VUS	ДКМП	<i>SOS1</i>
Примечание: ДВ – дополнительный вариант, АКМП - аритмогенная кардиомиопатия, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, СРС – сдвиг рамки считывания, MAF – частота минорного аллеля, PSI – индекс процента сплайсинга, ACMG – классификация патогенности Американского колледжа медицинской генетики и геномики, P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, VUS – вариант неопределенной значимости.									

Таблица 8 – Распределение причинных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в группе пациентов с кардиомиопатиями

Группа/ Параметр	<i>TTN</i>				<i>RBM20</i>
	Всего вар/пац (%)	В сочетании с P/LP в других генах	В сочетании с VUS в других генах	Изолированно	Всего
ДКМП (63 пац.)	9/8 (13%)	5/4 (6,3%) <i>MYH7, TNNI3, TNNT2</i>	3/3 (6,3%) <i>DSC2, NEXN, SALL4</i>	1/1 (4,8%%)	4/4 (6,3%)
НМЛЖ (30 пац.)	5/4 (13%)	1/1 (3,3%) <i>MYH7, NF1</i>	2/2 (6,6%) <i>MYOF, MYOM1</i>	2/1 (3,3%)	0/0 (0%)
РКМП (72 пац.)	6/5 (7%)	1/1 (1,4%) <i>MYH7</i>	2/2 (2,8%) <i>CACNA1C, KCNQ1</i>	3/2 (2,8%)	0/0 (0%)
АКМП (33 пац.)	2/2 (6%)	1/1 (3%) <i>SCN5A</i>	1/1(3%) <i>AKAP9</i>	0/0 (0%)	1/1 (3%)
ГКМП (53 пац.)	2/2 (4%)	1/1 (2%) <i>MYH7</i>	0/0 (0%)	1/1 (2%)	0/0 (0%)
Примечание: АКМП - аритмогенная кардиомиопатия, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, НМ – некомпактный миокард левого желудочка, РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, VUS – вариант неопределенной значимости.					

3.2.2 Клинические примеры кардиомиопатий с дилатационным фенотипом, обусловленных вариантами в гене *TTN*

В качестве причинных у пациентов с ДКМП нами было выявлено 13 вариантов в гене *TTN* и 4 варианта в гене *RBM20*. В качестве наиболее типичного примера ниже нами приводится клинический случай пациента с ДКМП, с дебютом заболевания в молодом возрасте.

Пациент С. 16 лет обратился в медпункт школы с жалобами на головную боль, слабость, головокружение. При осмотре была зафиксирована артериальная гипотензия около 90/50 мм. рт. ст., частота сердечных сокращений составила около 100 ударов в минуту (точные цифры не помнит). На следующий день в связи с ухудшением состояния была вызвана бригада скорой медицинской помощи. На электрокардиографии (ЭКГ) зарегистрирована синусовая тахикардия с частотой сердечных сокращений 105 в мин. Диффузные нарушения процессов реполяризации: отрицательные Т в I, II, III, aVF, глубокие отрицательные Т и минимальная депрессия сегмента ST в V4–V6, элевация ST на 1–2 мм в V1–V3. Пациент отказался от госпитализации и был оставлен дома под наблюдение. В последующие несколько дней состояние значительно не улучшилось, при консультации кардиолога в частном центре был выставлен диагноз вегетососудистой дистонии. Спустя неделю состояние пациента осложнилось развитием двусторонней пневмонией, при госпитализации изменения в миокарде трактовались в рамках сопутствующего вирусного миокардита. При проведении ЭКГ были повторно выявлены синусовая тахикардия, признаки перегрузки ЛЖ, нарушения реполяризации по переднебоковой стенке ЛЖ. По данным ЭхоКГ от 28.02.2020 – субтотальный гипокинез ЛЖ, выраженная дилатация левых камер сердца, умеренная митральная и трикуспидальная регургитация, ФВ по Симпсону составила 10%, наблюдалась повышенная трабекулярность ЛЖ по нижнебоковой стенке в апикальном сегменте (Таблица 9).

Таблица 9 – Динамика эхокардиографии данных пациента С.

Параметр/Дата исследования	28.02.2020	13.03.2020	30.06.2021	15.10.2021
ЛП, мм	–	–	46	45
КДО, мл	–	178	242	285
КСО, мл	–	–	178	205
КДР ЛЖ, мм	70	69	66	67
КСР ЛЖ, мм	–	–	55	58
ФВ ЛЖ, % (Simpson ВР)	10	25	29	29
Аортальный клапан	–	–	створки не изменены; Vmax 0.89 м/с	створки не изменены; Vmax 1.09 м/с, dPmax 4.77 мм рт. ст.
Митральный клапан	Выраженная митральная регургитация рДПЖ 55 мм рт.ст	–	створки не изменены; Ve 0.76 м/с, Va 0.55 м/с, Ve\Va 1.39, Tdec 99 мс, E/Em 7,13; регургитация 2 степени	створки не изменены; Ve 0.73 м/с, Va 0.47 м/с, Ve\Va 1.57, Tdec 118 мс, E/Em 5,54; регургитация приклапанная
УО, мл	–	–	42	82
Примечание: ЛП – левое предсердие, КДО – конечный диастолический объем, КСО – конечный систолический объем, КДР – конечный диастолический размер, КСР – конечный систолический размер, ЛЖ – левый желудочек, ФВ – фракция выброса.				

При нахождении в стационаре был зафиксирован эпизод острого нарушения мозгового кровообращения справа, при проведении дуплексного сканирования

сосудов головы и шеи был выявлен неокклюзивный тромбоз правой верхней яремной вены. На фоне терапии состояние пациента стабилизировалось, признаки ХСН частично регрессировали, пациент был выписан на амбулаторное лечение. В следующие 4 месяца пациент был дважды планово госпитализирован, значимой положительной динамики не наблюдалось: сохранялась артериальная гипотензия, дилатация левых камер сердца. При проведении суточного мониторирования электрокардиограммы (СМЭКГ) были зарегистрированы эпизоды неустойчивой желудочковой тахикардии и парные желудочковые экстрасистолы (Рисунок 24А).



Рисунок 24 – Результаты исследований пациента С.

Примечание: Парные полиморфные желудочковые экстрасистолы на электрокардиографии (А).
Локализация укорачивающего варианта в структуре гена тайтина (Б)

Для углубленного обследования и этиопатогенетического лечения пациент поступил в НМИЦ им.В.А.Алмазова. При обследовании был выставлен диагноз: дилатационная кардиомиопатия, осложненная левожелудочковой сердечной недостаточностью III ФК. При наблюдении в течение 5 месяцев отмечалась отрицательная динамика, была выполнена имплантация имплантируемого кардиовертер–дефибриллятора и пациент был включен в лист ожидания трансплантации сердца (ЛОТС). Спустя год пациент был повторно представлен на комиссии по трансплантации сердца, по результатам которой в связи со стабилизацией состояния и улучшением ряда показателей сердечно–легочной системы (тест шестиминутной ходьбы с 370 до 567 м, максимальное потребление кислорода с 15 до 23,2мл/кг/мин, ФВ ЛЖ в течение последних 6 мес. стабильно 29%, уменьшение митральной регургитации со 2 до 1 ст., дилатация камер без отрицательной динамики в сравнении с ЭхоКГ от 04.21 г. – конечный диастолический объем с 298 до 285, конечный систолический объем с 211 до 203) было принято решение о выводе пациента из активного листа ожидания. В течение последующих 2 лет состояние пациента оставалось стабильным, он находился под регулярным амбулаторным наблюдением, комплексной терапии ХСН без необходимости повторных госпитализаций.

Для уточнения этиологии заболевания пациенту было проведено генетическое исследование, в результате которого была обнаружена инсерция в гене *TTN* (chr2:179448352, NM_001267550.2:c.65557_65558insAGGTTCA). Данный вариант классифицируется как вероятно-патогенный. Он локализуется в А–зоне молекулы тайтина, в 312 экзоне, PSI которого составляет 100%, и кодирует домен фибронектина тип III (Рисунок 25Б). Информация по частоте данного варианта в международных базах данных отсутствует. Также был выявлен однонуклеотидный вариант неопределенной значимости в гене *SPEG* (chr2:220309864; rs752626494, NM_005876.5:c.C796T:p.Arg266Trp), который служит маркером дифференцированных клеток гладких мышц сосудов и играет важнейшую роль в

регуляции роста и дифференцировки данного типа клеток. Частота варианта в контрольной группе согласно базе данных GnomAD составляет 0,00111%. Данный клинический случай является иллюстративным примером обратного ремоделирования миокарда при проведении симптоматической терапии ХСН. Подобное обратное ремоделирование характерно для пациентов с КМП, обусловленной *TTNtv* [51], в отличие, например, от КМП, ассоциированных с патогенными вариантами в гене *MYH7* [190].

3.2.3 Клинические примеры некомпактного левого желудочка, обусловленного вариантами в гене *TTN*

В исследуемой группе пациентов нами было обнаружено два варианта в гене *TTN*, ассоциированных с развитием у пациентов НМЛЖ. Ниже приведен разбор одного из таких клинических случаев.

У пациента Д. 39 лет при профилактическом осмотре была выявлена полная блокада левой ножки пучка Гиса (ПБЛНПГ), активно жалоб не предъявлял. При проведении ЭхоКГ были выявлены умеренная дилатация ЛЖ и выраженная дилатация правых отделов сердца, парадоксальное движение межжелудочковой перегородки за счет ПБЛНПГ, выраженная трабекулярность верхушки ЛЖ (соотношение некомпактного и компактного слоев 2,2 к 1), в связи с чем был поставлен диагноз НМ левого желудочка. Для поиска этиологии наблюдаемых изменений было проведено генетическое исследование пациента, в результате которого была обнаружена нонсенс-мутация в гене *TTN* (chr2:179392275, NM_001267550.2:c.C107578T:p.Gln35860Ter, rs1009131948) (Рисунок 25). Данный вариант классифицируется как патогенный и имеет частоту 0,000803% в общемировой популяции и 0,000886% – в европейской. Он локализуется в М-линии молекулы тайтина, в 363 экзоне, PSI которого составляет 99%. (Рисунок 25Б). В последующем пациент продолжал наблюдаться амбулаторно, признаков значительного ухудшения течения сердечной недостаточности не наблюдалось,

нарушения ритма не прогрессировали и показаний для имплантации ИКД сформулировано не было.

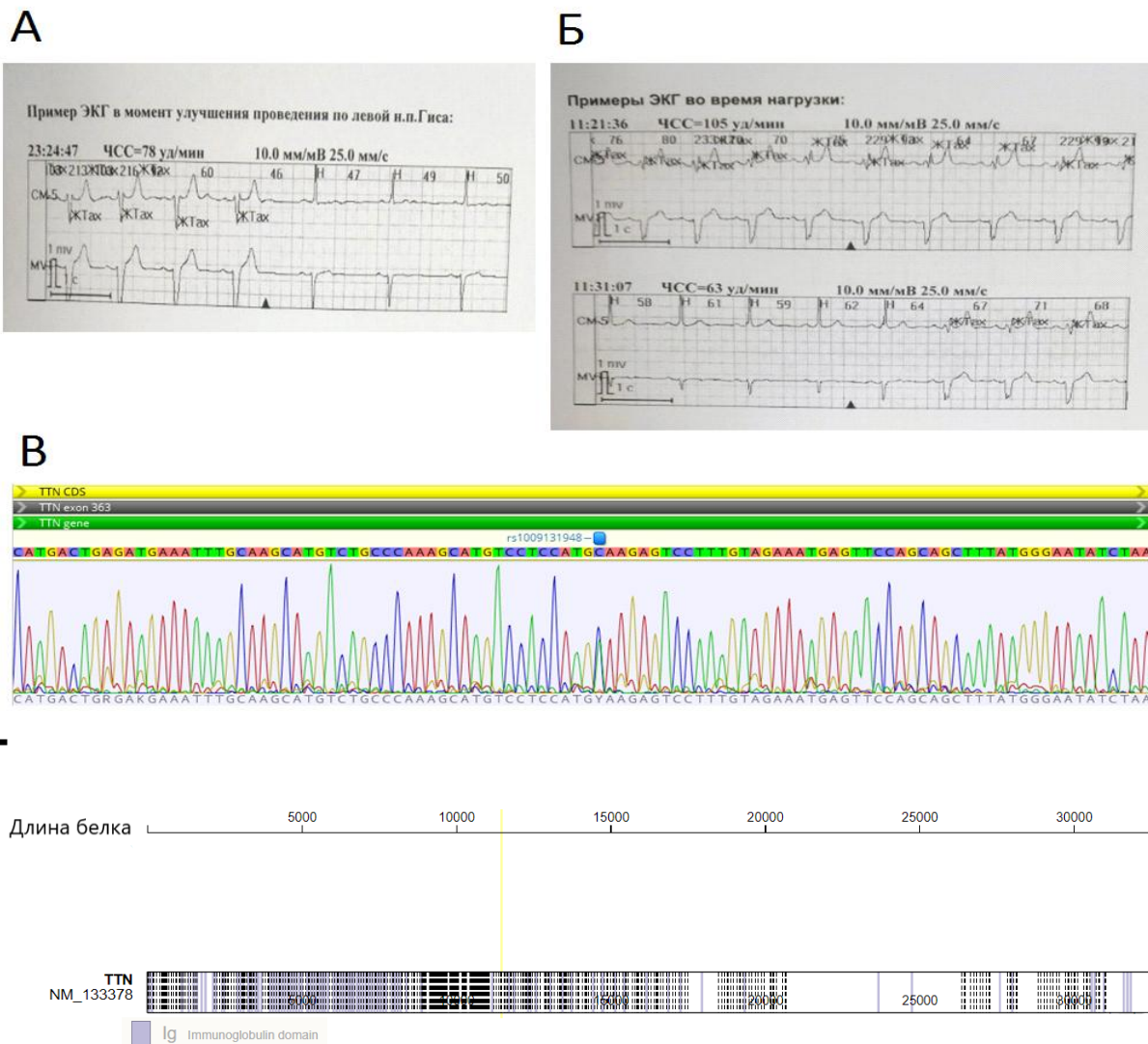


Рисунок 25 – Результаты исследований пациента Д.

Примечание: Электрокардиография пациента Д. с транзиторной блокадой левой ножки пучка Гиса (А). Электрокардиография пациента Д. в момент физической нагрузки (Б). Результаты секвенирования по Сэнгеру фрагмента гена *TTN* пациента Д (rs1009131948) (В). Локализация укорачивающего варианта в структуре гена тайтина (Г)

3.2.4 Клинические примеры кардиомиопатий со смешанным фенотипом или трансформацией фенотипов, обусловленные вариантами в гене *TTN*

В качестве смешанного фенотипа КМП нами рассматривались случаи сочетания нескольких типов КМП у одного пациента, в качестве трансформации фенотипов - переход из одного типа КМП в другой, например, из КМП гипертрофического или рестриктивного типа в дилатационный. Ниже приведено несколько клинических примеров, в которых варианты в гене *TTN* могут рассматриваться в качестве модулирующих течение заболевания и проводящих к изменению морфологической картины КМП.

Пациент М. 65 лет обратился на прием кардиолога с жалобами на одышку и давящий дискомфорт за грудиной при ходьбе до 50 метров, проходящий в покое, одышку при наклонах вперед. В 52 года пациент отметил снижение толерантности к физической нагрузке, и тогда впервые выявлено увеличение толщины стенок ЛЖ (16 мм) и снижение ФВ ЛЖ до 46%. Для исключения ИБС была проведена стресс-ЭхоКГ (проба положительная, высокого риска), однако, по данным коронарной ангиографии – гемодинамически значимых стенозов выявлено не было. Пациенту был поставлен диагноз ГКМП и назначена консервативная терапия. С 54 лет у пациента фиксируется постоянная форма ФП. Значительное ухудшение клинического состояния пациента наступило в 64 года, когда было отмечено прогрессирование бивентрикулярной сердечной недостаточности и учащение госпитализаций. По данным ЭКГ и СМЭКГ ведущим ритмом была ФП, нормосистолия, электрическая ось сердца отклонена вправо, диффузное снижение вольтажа в стандартных отведениях, регистрировались короткие пробежки желудочковой тахикардии из 5 комплексов (Рисунок 26А). ЭхоКГ в динамике выявило сначала умеренно низкую, а затем низкую ФВ ЛЖ (47—> 21 % по Simpson) и рестриктивный фенотип: предсердия были значительно дилатированы и превышали нормальные по размеру желудочки (Рисунок 26Б, 26В, Таблица 10).

Постепенное снижение толщины стенок ЛЖ на фоне сохранного конечного диастолического размера ЛЖ привело к смене концентрической гипертрофии ЛЖ концентрическим ремоделированием, а затем и к нормальной геометрии ЛЖ. В ходе МРТ сердца не получено данных за миокардит и болезни накопления (Рисунок 26Г, 26Д).

Таблица 10 – Динамика эхокардиографии пациента М., демонстрирующая снижение фракции выброса левого желудочка, прогрессирующее увеличение размеров предсердий на фоне сохранных размеров желудочков, признаки высокой легочной гипертензий и выпот большого объема в полости перикарда

Параметр/ Возраст	52 года (2007 год)	61 год (2016)	64 года (2020)	65 лет (2020)	66 лет (2021)
BSA, м ²	1,82	1,84	1,86	1,89	1,85
ЛП, мм	51	50	50	60	62
Объем ЛП, мл	–	109	113	155	118
ИОЛП, мл/м ²	–	59	61	82	64
МЖП, мм	16	12	11	12	8
ЗС ЛЖ, мм	10	13	13	12	8
ИММ, г/м ²	133	170	135	104	63
ОТС	0,38	0,48	0,48	0,53	0,34
Геометрия ЛЖ	Эксцентрическая ГЛЖ	Концентрическая ГЛЖ	Концентрическая ГЛЖ	Концентрическое ремоделирование	Нормальная геометрия
ФВ ЛЖ, % (Simpson)	46	46	30	21	46
КДР, мм	56	52	50	45	47
КСР, мм	43	39	–	40	37
КДО, мл	153	129	140	93	99
КСО, мл	83	66	98	73	54

УО, мл	70	63	42	20	45
ПП, мм	46	47*66	56*73	49*68	44*72
ПЖ 4хкам, мм	–	31	37	44	42
ТАPSE, мм	–	–	15	8	>16
РСДЛА, мм рт.ст.	–	Не определяется	55	69	60
НПВ коллабирует на вдохе	Более 50%	Более 50%	Менее 50%	Не коллабирует	Менее 50%
Клапаны	Норма	МР 1, ТР и ПР приклапанн ые	МР 2–3 эксцентрическа я, под ЗС МК. В проекции задней створки МК со стороны ЛЖ – остаток хорды 3 мм. ТР 1, ПР 1.	МР 2, ТР 2, ПР 1	МР 1–2. ТР 1–2. ПР приклапанна я.
Расхождение листков перикарда	Норма	Минималън ое (под ПП – 3 мм)	Максимальное до 25 мм вдоль задней, нижней стенки ЛЖ	Максимальн о до 31 мм за ЛЖ.	Максимальн о до 15 мм за ЛЖ

Примечание: ЛП – левое предсердие, ИОЛП – индекс объема левого предсердия, МЖП – межжелудочковая перегородка, ЗС ЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ИММ – индекс массы миокарда, ОТС – относительная толщина стенок ЛЖ, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, КДР – конечный диастолический размер, КСР – конечный систолический размер, КДО – конечный диастолический объем, КСО – конечный систолический объем, УО – ударный объем, ПП – правое предсердие, ПС ПЖ – правая стенка правого желудочка, ТАPSE – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана, РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии, НПВ – нижняя полая вена, МР – митральная регургитация, ТР – трикуспидальная регургитация, ПР – пульмональная регургитация.

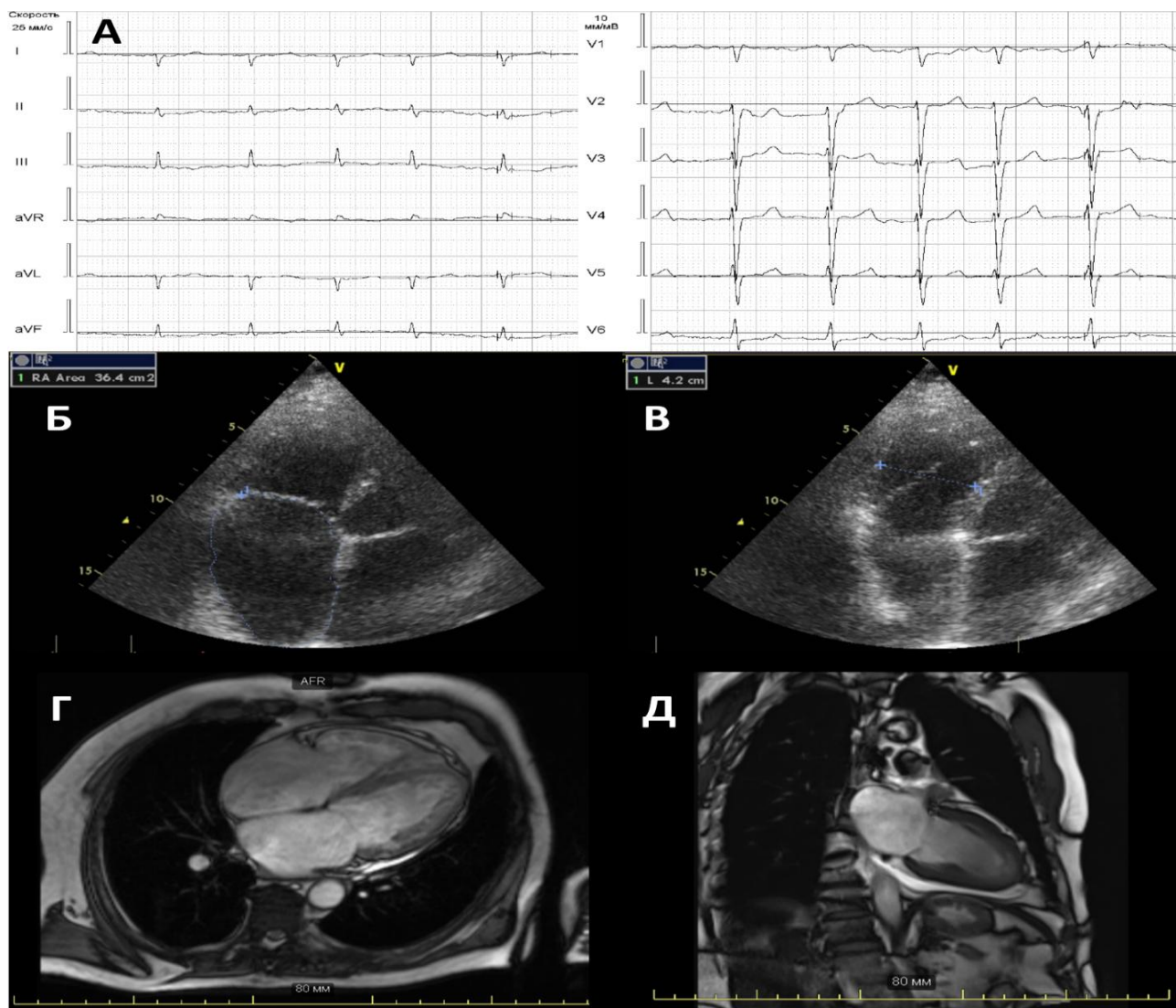


Рисунок 26 – Результаты исследований пациента М.

Примечание: Электрокардиограмма пациента М., демонстрирующая ритм фибрилляции предсердий, диффузное снижение вольтажа в стандартных отведениях, отклонение электрической оси сердца вправо (А). Эхокардиография пациента М. из апикальной четырехкамерной позиции, синим пунктиром отмечено значительно дилатированное правое предсердие (Б), нормальный по размеру левый желудочек (В). Магнитно-резонансная томография пациента М. в четырехкамерной и двухкамерной позициях с характерным для рестриктивной кардиомиопатии соотношением предсердий и желудочков, виден выпот в полости перикарда (Г, Д)

С учетом возраста, множественной сопутствующей патологии, высокой легочной гипертензии пациент не рассматривается как кандидат на трансплантацию сердца. На фоне назначения поликомпонентной базисной терапии ХСН, и коррекции диуретической терапии у пациента в динамике отмечалось нарастание ФВ ЛЖ до 46% и регрессирование симптомов ХСН до II ФК.

Для уточнения этиологии данного патологического состояния с учетом низкого вольтажа комплекса QRS и трансформации ГКМП в рестриктивный фенотип со снижением сократительной способности миокарда пациенту проводилось исключение болезней накопления и наследственных форм амилоидоза и других КМП. Было проведено генетическое исследование и выявлено несколько генетических вариантов, потенциально ассоциированных с поражением миокарда: патогенный вариант в гене *TTN* (chr2:179436750, NM_001256850.1:c.69185_69186delCA) и вероятно патогенный вариант в гене *MYH7* (chr14:23901955, NM_000257.4:c.C395T;p.Pro132Leu), а также вариант неопределенной значимости в гене *TRPM4* (chr19:49686055, NM_017636.4:c.C1484G;p.Ala495Gly, rs756114804). Вариант Pro132Leu в гене *MYH7* ранее был ассоциирован с развитием гипертрофической кардиомиопатии и, вероятнее всего, определял у данного пациента развитие гипертрофии миокарда с толщиной стенок 16 мм и фенотип ГКМП на ранних этапах развития заболевания до присоединения систолической дисфункции и признаков рестриктивного ремоделирования. Таким образом, вклад варианта Pro132Leu в гене *MYH7* в формирование изначальных признаков заболевания с учетом данных литературы не представлялся сомнительным, однако, он не мог полностью объяснить наблюдаемую у пациента динамику развития заболевания. Выявленная помимо него делеция со сдвигом рамки считывания в гене *TTN* локализуется в А-зоне молекулы тайтина, в 325 экзоне, процент сплайсинга (PSI) которого составляет 100%, и кодирующем домен фибронектина тип III. Наличие данного варианта дополнительного к *MYH7* укорачивающему варианту в гене *TTN*, вероятно

определило особенности клинического течения данного заболевания, заключающиеся в необычной трансформации фенотипа и стремительном прогredientном снижении сократимости миокарда и развитием дилатации при присоединении сопутствующей патологии.

Пациент Г., мужчина 30 лет, обратился к кардиологу в связи с информированностью об отягощенном наследственном анамнез по сердечно-сосудистой патологии и желанием пройти каскадный семейный скрининг. На тот момент пациент не имел жалоб, был нормостенического телосложения, без вредных привычек, вёл здоровый образ жизни с преобладанием умственных нагрузок в трудовой деятельности.

Из анамнеза известно, что отцу пациента был поставлен диагноз дилатационной кардиомиопатии в возрасте 48 лет, когда после перенесенной острой респираторно-вирусной инфекции он был госпитализирован в тяжелом состоянии с явлениями декомпенсации сердечной недостаточности по обоим кругам с ФВ ЛЖ по Тейхольц 12%, и в ускоренном порядке был включен в лист ожидания на трансплантацию сердца. Ухудшение состояния произошло на фоне длительного стажа курения и злоупотребления алкоголем. В последующем в связи с улучшением на фоне оптимальной медикаментозной терапии и отказа от вредных привычек был выведен из листа ожидания на трансплантацию. К возрасту 60 лет ФВ ЛЖ отца составляет 30%, явления ХСН компенсированы на уровне 1 ФК.

При обследовании пациента ЭхоКГ в динамике в возрасте 30–32 лет выявила сохранную ФВ на нижней границе нормы (50–54% по Симпсону), дилатацию ЛЖ (конечный диастолический объем 171 мл) и умеренную дилатацию левого предсердия (ЛП) (индекс объема левого предсердия 53 мл/м²), а также первичную митральную регургитацию умеренной степени (эффективная площадь отверстия регургитации 30 мм), эксцентричной струей под заднюю створку митрального клапана (Таблица 11). Створки митрального клапана были миксоматозно изменены, утолщены, “рыхлые” и пролабировали в полость ЛП. В динамике

отмечалось нарастание дилатации ЛЖ с формированием эксцентрической гипертрофии ЛЖ, нарастание расчетного систолического давления в легочной артерии (35 мм рт.ст.), соответствующее легкой степени легочной гипертензии (Таблица 11). По данным ЭКГ и ЭхоКГ – синусовый ритм, ЧСС составила от 55 до 188 уд/мин (средняя 87 уд/мин), значимые нарушения проводимости, патологическая эктопическая активность не выявлены. МРТ сердца не выявило убедительных данных за текущий или перенесенный миокардит как причину дилатации камер сердца. В ходе стресс–ЭхоКГ данных за ИБС не получено, на высоте нагрузки отмечено нарастание степени митральной регургитации. С учетом структурной патологии сердца взят анализ на N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида (NT-proBNP) – 25,39 пг/мл (норма), данных за наличие синдрома сердечной недостаточности выявлено не было.

Для поиска этиологии данных нарушений было проведено генетическое исследование. У отца пациента были обнаружены вероятно патогенный вариант в гене *TTN* (chr2:179426299, NM_001267550.2:c.84559_84560del) и вариант неопределенной значимости в гене *TNNT2* (chr1:201333455, NM_001276345.2:c.C460T;p.Arg154Trp), у самого пробанда был определен изолированный вариант в гене *TTN*. Обращает на себя и агрессивное течение заболевания и быстрое прогрессирование дилатации камер сердца у отца пробанда на фоне воздействия неблагоприятных токсических факторов и наличия комбинации двух генетических вариантов, в то время как у самого пробанда укорачивающий вариант *TTNtv* вне провоцирующих факторов ассоциирован с более благоприятным, субклиническим течением заболевания.

Таблица 11 – Динамика эхокардиографии пациента Г. с семейной формой дилатационной кардиомиопатии и умеренной митральной регургитацией

Параметр/ Возраст	30 лет (2020 год)	31 год (2020 год)	32 года (2021 год)
BSA, м ²	2,10	2,10	2,06
ЛП, мм	41	41	41
Объем ЛП, мл	–	–	109
ИОЛП, мл/м ²	–	–	53
МЖП, мм	9	9	9,5
ЗС ЛЖ, мм	8	8	9
ИММ, г/м ²	101	107	127
ОТС	0,27	0,27	0,28
Геометрия ЛЖ	Нормальная	Нормальная	Эксцентрическая ГЛЖ
ФВ ЛЖ, % (Simpson)	50	53	54
КДР, мм	62	64	66
КСР, мм	46	46	47
КДО, мл	171	166	180
КСО, мл	75	67	87
УО, мл	96	99	93
ПЖ параст, мм	31	31	38
ТАРСЕ, мм	–	–	30
РСДЛА, мм рт.ст.	20	20	35
Митральный клапан	S _{планиметр} > 4 см ² Умеренная регургитация	S _{планиметр} > 4 см ² Умеренная регургитация	Умеренная регургитация EROA = 30 мм ²

Примечание: ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка, ЗС ЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ИММ – индекс массы миокарда, ИОЛП – индекс объема левого предсердия, КДО – конечный диастолический объем, КДР – конечный диастолический размер, КСО – конечный систолический объем, КСР – конечный систолический размер, ЛП – левое предсердие, МЖП – межжелудочковая перегородка, МР – митральная регургитация, ОТС – относительная толщина стенок левого желудочка, ПЖ – правый желудочек, РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии, УО – ударный объем, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, BSA – площадь поверхности тела, EROA – эффективная площадь отверстия регургитации, TAPSE – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана.

3.2.5 Клинический пример кардиомиопатий с аритмогенным фенотипом, ассоциированный с вариантом в гене *RBM20*.

Пациент К. в возрасте 26 лет без отягощенной наследственности был госпитализирован в кардиологическое отделение НМИЦ им.В.А.Алмазова в связи с повторяющимися эпизодами синкопе, ассоциированными со стрессовыми ситуациями, а также жалобами на перебои в работе сердца по типу экстрасистол и частые эпизоды учащенного сердцебиения. При ЭхоКГ не было выявлено каких-либо структурных нарушений миокарда, в том числе пороков сердца, признаков кардиомиопатии и нарушения геометрии камер сердца. При проведении СМЭКГ у пациента отмечались полиморфные желудочковые экстрасистолы, эпизоды нестабильной полиморфной желудочковой тахикардии, элевация сегмента ST в отведениях V1–V2 и неполная блокада правой ножки пучка Гиса (Рисунок 27 А, Б). В качестве предварительного диагноза был выставлен синдром Бругада, однако он не был подтвержден провокацией с новокаиномидом и эндокардиальным электрофизиологическим исследованием. Биопсия миокарда показала наличие незначительной гипертрофии, липоматоза и незначительного фиброза, без признаков воспаления и миокардита (4CD45+, 4CD3+/мм², HLA-DR «-») (Рисунок 27 В). В связи с повторяющимися синкопальными состояниями пациенту

был установлен имплантируемый кардиовертер–дефибриллятор и назначено лечение бета-блокаторами (75 мг метопролола). В дальнейшем эпизоды желудочковой тахикардии и учащенного сердцебиения участились, что потребовало увеличения дозировки метопролола до 100 мг и назначения соталола в количестве 80 мг в день. При этом изменений на ЭхоКГ не наблюдалось, и пациент остается клинически стабильным по настоящее время.

При генетическом исследовании у данного пациента удалось выявить однонуклеотидный вариант в гене *RBM20* (chr10:112572502, NM_001134363:c.A2347G:p.Arg783Gly, rs1287523613), частота которого в популяции составляет 0,000639%. Согласно классификации ACMG данный вариант является вариантом неопределенной значимости, хотя согласно нескольким компьютерным программам, предсказывающим патогенность варианта (DNAA, EIGEN PC, FATHMM–MKL, FATHMM–XF, MutationTester, SIFT and SIFT4G), он является повреждающим или патогенным, так как расположен в консервативной части гена.

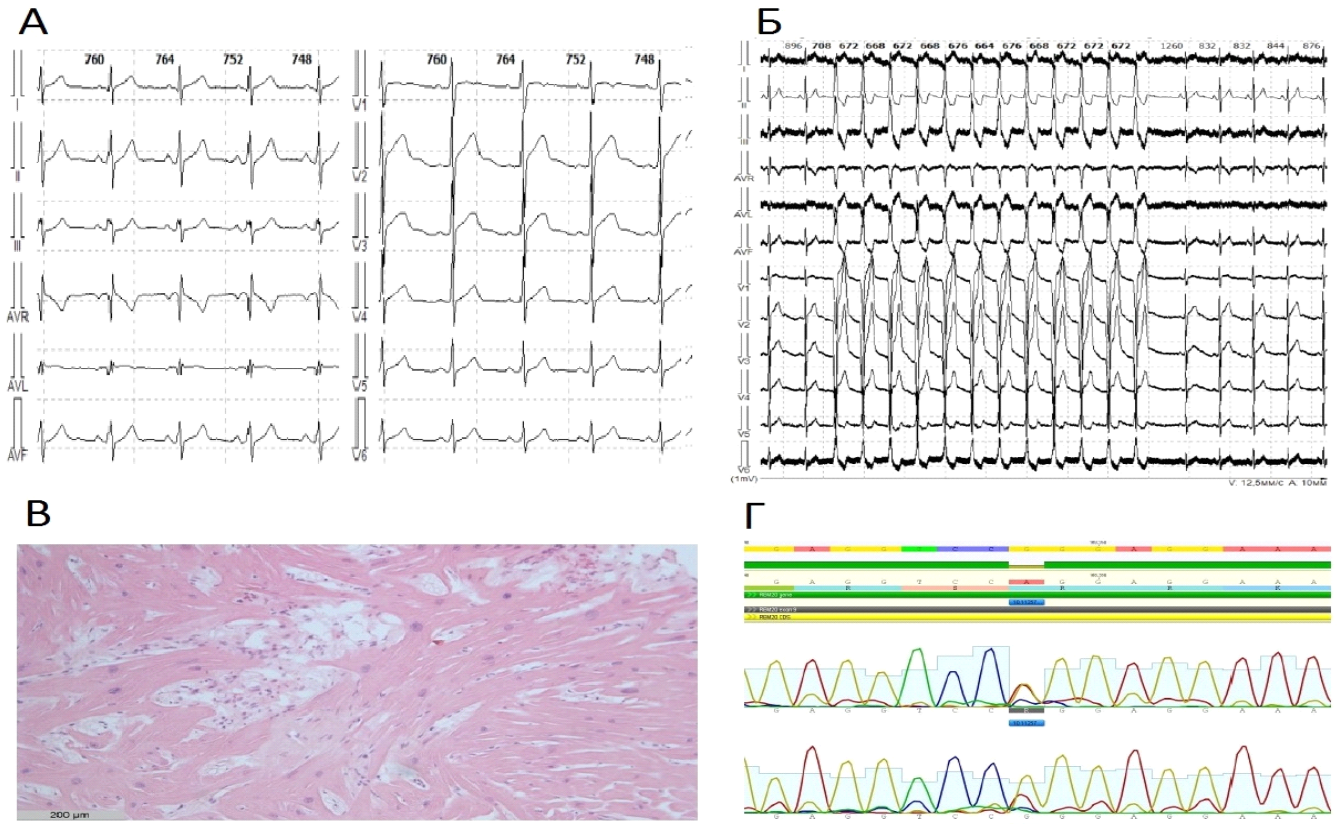


Рисунок 27 – Результаты исследований пациента К.

Примечание: Седловидный подъем сегмента ST в сочетании с неполной блокадой правой ножки пучка Гиса (А). Эпизод нестабильной желудочковой тахикардии (Б). Образец биопсии миокарда с признаками гипертрофии кардиомиоцитов, липоматозом и отсутствием крупных участков фиброза (В). Секвенирование по Сэнгеру, подтверждающее нуклеотидную замену (Г)

Поскольку белок RBM20 является фактором сплайсинга генов, кодирующих не только *TTN*, но и многие ионные каналы, такие как *SCN5A* и *CACNA1C*, возможно его участие в обеспечении процессов возбудимости и проводимости и развитием проаритмогенного фенотипа без прямого эффекта в отношении гена *TTN*.

Таким образом, среди пациентов взрослого возраста чаще встречаются КМП, обусловленные патогенными вариантами в гене *TTN*, и реже – в гене *RBM20*. При этом преобладает дилатационный или смешанный фенотип, а аритмогенный

встречается крайне редко, который, и, возможно, ассоциирован с вариантами в гене *RBM20*.

3.2.6 Особенности клинической картины кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в генах *TTN* и *RBM20* у пациентов детского возраста.

Известно, что ген *RBM20* в качестве причины развития ДКМП более часто встречается у пациентов детского возраста с дебютом заболевания в возрасте старше 1 года [155]. В то время как особенностью *TTN*-ассоциированных форм ДКМП является как раз их дебют в более старшей возрастной группе и более благоприятный прогноз. В связи с этим нами отдельно была проанализирована группа пациентов с дебютом заболевания в детском возрасте (от 0 до 18 лет) с КМП, ассоциированными с мутациями в генах *RBM20* и *TTN*. Нами приведены 7 клинических примеров (один выше в разделе «Дилатационный фенотип» и 6 ниже), характеризующих течение *RBM20* и *TTN*-ассоциированных форм КМП в группе пациентов детского возраста.

Клинический пример 1

Пациент Т. находился под наблюдением кардиолога с рождения в связи с выявленным гемодинамически значимым дефектом межпредсердной перегородки (ДМПП). В течение первого года жизни были зарегистрированы расширение правых камер сердца, снижение сократительной способности миокарда, формирование легочной гипертензии. При СМЭКГ была зарегистрирована транзиторная атриовентрикулярная блокада 2 степени 1 типа. В возрасте 4 лет пациенту было проведено оперативное вмешательство: закрытие ДМПП в условиях искусственного кровообращения. К семи годам отмечалось нарастание клиники сердечной недостаточности, расширение правого предсердия, правого и левого желудочков (ФВ ЛЖ по Тейхольц 49%, по Симпсону 36%, систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана 11,6 см, скорость движения латеральной части фиброзного кольца трикуспидального клапана 13 см/с),

появление пароксизмов наджелудочковой тахикардии с частотой сердечных сокращений (ЧСС) от 115 до 208 уд/мин. Появились безболевые эпизоды косонисходящей депрессии сегмента ST в отведениях от нижнебоковой стенки ЛЖ во время физической активности. При проведении МРТ сердца в возрасте 10 лет выявлена повышенная трабекулярность апикальных отделов боковой стенки ЛЖ и верхушки ЛЖ. Толщина некомпактной части на уровне боковой стенки составляла 7 мм, компактной – 4 мм; на уровне верхушки 13 мм и 3,5 мм соответственно. Было констатировано сочетание двух типов КМП: дилатационной и некомпактного миокарда ЛЖ. В дополнение при неврологическом осмотре отмечалась умеренная мышечная слабость, миалгии, снижении силы работы дыхательных мышц при исследовании функции внешнего дыхания.

Пациентка И. (старшая сестра пациента Т.) была обследована в рамках семейного скрининга в связи с наличием НМ и ДКМП у младшего брата. В возрасте восьми лет была выявлена дилатация левого предсердия и ЛЖ, недостаточность митрального клапана 2–3 степени, признаки выраженной гипертрабекулярности миокарда в области верхушки без достижения критериев НМ. На МРТ наблюдалась дилатация камер сердца и снижение сократимости миокарда правого желудочка. Был выставлен диагноз ДКМП, хроническая сердечная недостаточность 2 функционального класса. В возрасте 16 лет при обследовании неврологом отмечался умеренно выраженный миопатический синдром (проксимальная мышечная слабость в ногах до 4 баллов), псевдогипертрофия икроножных мышц, раннее снижение коленных сухожильных рефлексов, выраженные миалгии в ногах, изменение походки по типу «утиной», поясничный гиперлордоз, «полая стопа». При биохимическом обследовании уровни креатинин–фосфокиназы, лактатдегидрогеназы и лактата повышены не были.

Для уточнения этиологии заболевания пациентам было выполнено генетическое исследование. У обоих пациентов была обнаружена делеция в гене

TTN размером в тринадцать нуклеотидов со сдвигом рамки считывания (chr2:179425207, NM_001256850.1:c.80717_80729del, rs762286447) (Рисунок 28). Данный генетический вариант классифицируется как патогенный и имеет частоту 0,000807% в общемировой популяции и 0,000891% – в европейской. Он локализуется в А–зоне молекулы тайтина, в 327 экзоне, PSI которого составляет 100%, и кодирует домен фибронектина тип III. Таким образом данный клинический пример иллюстрирует семейный случай ДКМП с признаками НМЛЖ с дебютом в детском возрасте на фоне укорачивающего варианта в гене *TTN*. Также обращает внимание наличие умеренного нейромышечного фенотипа у обоих пациентов с вовлечением дыхательной мускулатуры (у пробанда), а также сочетание КМП со структурными нарушениями миокарда, в частности ДМПП.

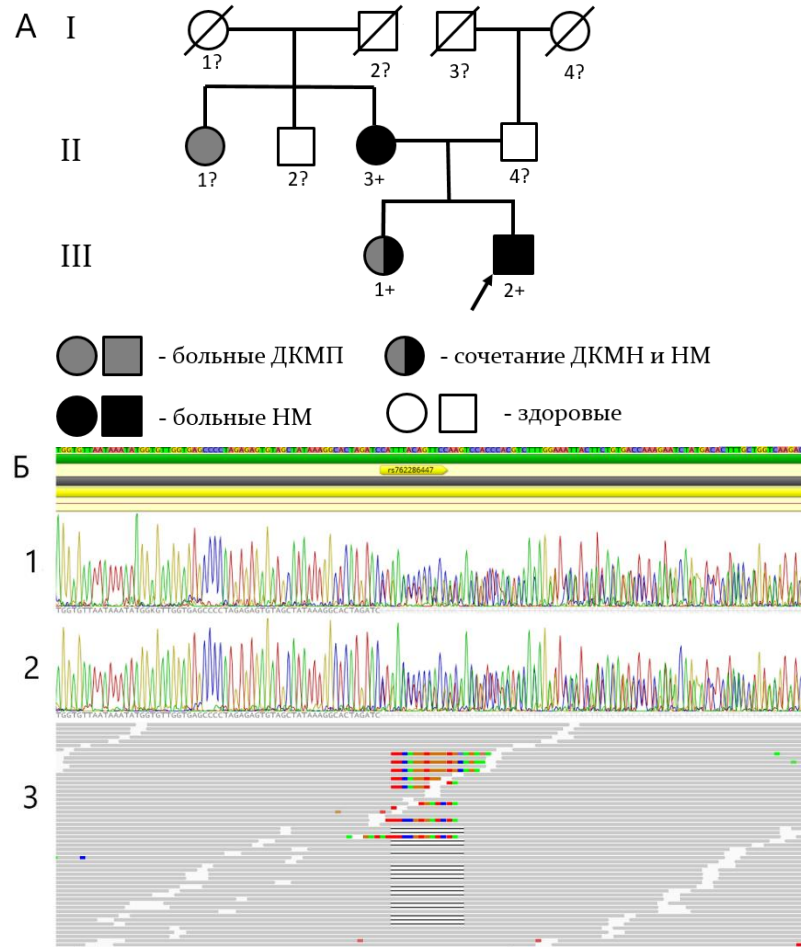


Рисунок 28 – Результаты исследований пациентов Т. и И.

Примечание: (А) Родословная пациентов Т. и И. (Б) Результаты секвенирования пациентов Т. и И., показана зона делеции 13 нуклеотидов rs762286447 1 – секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *TTN* пациента Т., 2 – секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *TTN* пациентки И., 3 – высокопроцессивное массовое параллельное секвенирование образца дезоксирибонуклеиновой кислоты пациента Т. в области гена *TTN*, НМ – некомпактный миокард, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия

Клинический пример 2

Пациент С. наблюдался кардиологом с 1 года в связи с синусовой брадикардией. Наследственный анамнез в отношении КМП отягощен (у отца ДКМП, ФВ 33–40%, неустойчивая желудочковая тахикардия). В возрасте 1 года 10 месяцев при проведении скрининговой ЭхоКГ в связи с наличием в семье

наследственного кардиологического заболевания была выявлена повышенная трабекулярность ЛЖ, ФВ 60%, при ЭКГ зарегистрирован эктопический предсердный ритм, ЧСС 70 уд/мин. В возрасте 7 лет выявлена легкая дилатация ЛЖ, а также участок некомпактного миокарда в области нижней стенки (по данным ЭхоКГ-компактный слой 6 мм, некомпактный 9 мм, по данным МРТ - толщина некомпактной части 10 мм, компактной на этом уровне 5 мм). По данным ЭКГ наблюдается миграция водителя ритма по предсердиям с изменением ЧСС при смене положения тела (лежа 68 уд/мин, стоя – 100 уд/мин). При проведении СМЭКГ был зарегистрирован 1081 эпизод наджелудочковой экстрасистолии, в покое и во время сна – эпизоды миграции водителя ритма, правопредсердного ритма, максимальная пауза – 1456 мсек на фоне миграции водителя ритма. В возрасте 8 лет по данным ЭхоКГ отмечалась умеренная дилатация полости ЛЖ (z-score 2,49), повышенная трабекулярность задней стенки ЛЖ, а также диастолическая дисфункция 3 степени.

Для уточнения этиологии заболевания и с учетом семейного анамнеза было проведено генетическое исследование, в результате которого был обнаружен однонуклеотидный вариант в гене *RBM20* (chr10:112572068, NM_001134363.3:c.C1913A:p.Pro638Gln, rs267607003). Данный вариант классифицируется как вероятно патогенный, поскольку располагается в «горячей точке», замены в этом же кодоне описаны при ДКМП и данный вариант не встречается в популяции. Таким образом у пациента наблюдаются начальные признаки ДКМП с дебютом в детском возрасте без признаков вовлечения нейромышечной системы (дилатационный фенотип с признаками некомпактного миокарда ЛЖ), ассоциированные с наджелудочковыми нарушениями ритма и проводимости, на фоне патогенного варианта в гене *RBM20*.

Клинический пример 3

Пациентка К. заболела остро в возрасте 10 лет, была госпитализирована в реанимационное отделение с явлениями острой сердечной недостаточности. По данным ЭхоКГ отмечалось увеличение полостей, снижение сократимости миокарда ЛЖ до 20%. По данным МРТ определялась диффузная гипокинезия стенок, повышенная трабекулярность миокарда, толщина компактного слоя составила 5 мм, некомпактного слоя – 10 мм. Также отмечался отек миокарда на уровне базальных и средних отделов межжелудочковой перегородки, задержка выведения контрастного препарата в области передней стенки трансмурально и признаки хронических воспалительных изменений. При проведении СМЭКГ было зарегистрировано 1,4 тысячи желудочковых экстрасистол в течение суток, АВ блокада II степени 2 типа. Ухудшение состояния связано с перенесенной накануне вирусной инфекцией (с симптомами гастроэнтероколита и субфебрильной температурой) и развитием рефрактерных к терапии эпизодов нарушения ритма. Несмотря на комплексную антиаритмическую терапию (бета-блокаторы, кордарон, коррекция электролитного баланса) отмечалось прогрессирование желудочковых нарушений ритма с развитием многократных рефлексорных к терапии эпизодом желудочковой тахикардии с переходом в фибрилляцию желудочков. Смерть пациентки произошла на фоне неэффективности реанимационных мероприятий и развития асистолии.

При поступлении в стационар для уточнения этиологии заболевания было проведено генетическое исследование и обнаружен однонуклеотидный вариант в гене *RBM20* (chr10:112404325, NM_001134363:c.C113G:p.Pro38Arg). Данный вариант является ранее не описанным, согласно некоторым шкалам предикативной оценки, таким как FATHMM, M-CAP и SIFT данный вариант классифицируется как повреждающий и в соответствии с классификацией ACMG может рассматриваться как вариант неопределенной значимости. С учетом типичной клиники заболевания (ДКМП, нарушения ритма, признаки НМ) данный вариант с

большой вероятностью может рассматриваться как причинный в отношении данного заболевания.

Клинический пример 4

Пациентка Г. наблюдалась кардиологом с рождения в связи с тем, что в антенатальном периоде (третьем триместре беременности матери) был обнаружен дефект межжелудочковой перегородки (ДМЖП) до 3,5 мм, гемодинамически незначимый. Девочка родилась на сроке 38 недель. По данным ЭхоКГ, выполненным до рождения: ДМЖП – 2 мм, расширение полости ЛЖ (конечный диастолический размер (КДР) – 26 мм), снижение фракции выброса (55%). За три последующих месяца произошло значительное прогрессирование дилатации ЛЖ: КДР – 39 мм, фракция выброса – 30%, митральная недостаточность II степени (около 40%), повышена трабекулярность миокарда ЛЖ с умеренной гипертрофией задней стенки (компактный слой – 3,3 мм, некомпактный – 6 мм). Выставлен диагноз ДКМП, недостаточность кровообращения IIa. Был рекомендован ЭхоКГ контроль в динамике, по результатам которого наблюдалось снижение дилатации левых камер сердца (Таблица 12). По данным холтеровского мониторирования желудочковых нарушений ритма не зарегистрировано. В последующем в течение 3 лет наблюдалось постепенное повышение сократительной функции миокарда (фракция выброса – 42-55%), в связи с чем комплаенс в отношении терапии был значительно снижен, и пациентка в течение 3 лет не получала регулярной терапии ХСН. В возрасте 6 лет при осмотре отмечалось сохранение дилатации левого желудочка, фракция выброса – 46%, диффузная гипокинезия стенок, сохранение сократительной функции правого желудочка, увеличение трабекулярности миокарда без достижения критерием некомпактного миокарда. Были даны рекомендации о возобновлении терапии ХСН (верошпирон, капотен).

Таблица 12 – Динамика эхокардиографии данных пациентки Г.

Параметр/ Дата исследования	27.10.2016 г.	23.10.2017 г.	16.01.2018 г.	19.12.2019 г.	15.12.2022 г.
ЛП, мм (Z-score*)	20,1 (дефект МПП) (-0,52)	26 (0,83)	22 (-0,6)	24 (-1,15)	26,9 (-0,95)
МЖП, мм (Z-score)	6,4 (4,35)	6 (2,52)	5,7 (1,54)	5 (-1,43)	7,8 (2,43)
КДР ЛЖ, мм (Z-score)	38,2 (5,54)	45 (7,87)	45 (7,34)	42 (2,62)	46,2 (2,38)
КСР ЛЖ, мм (Z-score)	32,9 (10,61)	39 (13,24)	37 (11,4)	33 (6,56)	33,3 (3,8)
КДО, мл (Z-score)	62,7 (4,69)	91 (5,61)	96 (5,82)	81 (3,05)	66 (0,76)
ФВ ЛЖ, % (Тейхольц)	30,1	26	36	44	54,1
Митральный клапан	Регургитация 2 степени, недостаточно 2 степени	Регургитация 2 степени	Регургитация 3 степени	Регургитация 1–2 степени	Регургитация 1–2 степени
Трикуспидальный клапан	Регургитация 1 степени	Регургитация приклапанная	Регургитация 1 степени	Регургитация 1 степени	Регургитация 1 степени
УО, мл	18,9	-	35	35	-
Примечание: * – показатель Z-score вычислялся на основе весоростовых характеристик при использовании системы данных детского госпиталя Бостона (zscore.chboston.org), КДО – конечный диастолический объем, КДР – конечный диастолический размер, КСР – конечный систолический размер, ЛП – левое предсердие, МЖП – межжелудочковая перегородка, УО – ударный объем, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка.					

Для уточнения этиологии заболевания пациентке было проведено генетическое тестирование, в результате которого была обнаружена однонуклеотидный вариант в гене *RBM20* (NM_001134363.3:c.A1141G:p.Arg381Gly). Данный вариант является ранее не

описанным, в соответствие с данными предиктивного моделирования трактуется в соответствие с большинством программ как доброкачественный или неопределенного значения (за исключением SIFT), и в соответствие с ACMG с учетом фенотипа заболевания может трактоваться как вариант неопределенной значимости.

Клинический пример 5

У пациента Б. в возрасте 15 лет после перенесенной острой респираторной вирусной инфекции появились жалобы на одышку, утомляемость, перебои в работе сердца. При проведении ЭКГ и ЭхоКГ отмечались миграция водителя ритма по предсердиям, ФВ ЛЖ составляла 59% по Тейхольц (амбулаторно). Через полгода пациент был отметил резкое ухудшение состояния, жалобы на боли за грудиной, резкую слабость, одышку в покое. Отмечалось снижение артериального давления (60-70/45 мм.рт.ст.) и тахикардия (ЧСС 136 уд/мин), в связи с чем пациент был экстренно госпитализирован. На ЭхоКГ отмечалась дилатация всех камер, ФВ ЛЖ 20-25%, выпот в плевральные полости. Пациент был экстренно переведен в отделение реанимации ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова» с представлением о ХСН и развитии кардиогенного шока в рамках острого миокардита. На фоне проводимого лечения отмечалась относительная стабилизация клинического состояния пациента (минимальное улучшение самочувствия, аппетита), однако сохранялось снижение толерантности к физической нагрузке, слабость, вялость. По данным ЭхоКГ наблюдалась отрицательная динамика в виде увеличения размеров левых камер сердца (КДР ЛЖ до 64 мм, ЛП до 41,5 мм), степени митральной недостаточности, сократительная способность миокарда левого желудочка сохранялась на прежнем уровне (ФВ Симпсон 28%, ФВ 26% по Тейхольцу). Также отмечалась отрицательная динамика лабораторных показателей (повышение уровня тропонина, NT-proBNP).

Через несколько присоединились нарушения ритма по типу частой желудочковой экстрасистолия по типу бигеминии (длительные эпизоды). При выполнении диагностической эндомикардиальной биопсии и проведении гистологического исследования миокарда отмечалась гипертрофия, дисконкомплексация и дистрофия мышечных волокон, некроз с агрессивной реакцией клеток воспаления, мелкоочаговый фиброз и фиброз – оплетка, не противоречащие диагнозу активного вирусного миокардита. Однако, при сборе семейного анамнеза стало известно, что мать пациента умерла через 2 месяца после родов с диагнозом перипартальной КМП, в связи с чем был заподозрен наследственный характер заболевания и было выполнено развернутое генетическое тестирование. В результате была обнаружен однонуклеотидный вариант в гене *RBM20* (chr10:112581114, NM_001134363.2:c.G2737A:p.Glu913Lys, rs397516607), который ранее неоднократно был описан у пациентов с ДКМП и на сегодняшний день классифицируется как патогенный [45].

Учитывая необратимое снижение сократительной способности миокарда, развитие жизнеугрожающих желудочковых нарушений ритма, неэффективность медикаментозной терапии, включающую комбинированную инотропную поддержку и с учетом наследственного генетически-детерминированного заболевания, было принято решение о включении пациента в ЛОТС. В связи с тяжестью состояния пациента была имплантирована система экстракорпоральной мембранной оксигенации с последующим успешным проведением трансплантации сердца.

Клинический пример 6

Пациент Р. наблюдался в федеральном центре с возраста 16 лет, когда у него впервые появились эпизоды головокружений и пресинкопальных состояний, по результатам обследования и выполнения ЭхоКГ были выявлены признаки гипертрофической кардиомиопатия (ГКМП): ФВ по Симпсон 72%, толщина

межжелудочковой перегородки 16 мм, задняя стенка ЛЖ 14 мм, обструкции выносящего тракта ЛЖ документировано не было. Пациенту была назначена терапия бета-блокаторами и даны рекомендации о регулярном диспансерном наблюдении.

При обследовании через 7 месяцев было отмечено прогрессирующее снижение ФВ ЛЖ до 47%, появление дилатации ЛЖ (межжелудочковая перегородка 17 мм, задняя стенка ЛЖ 12 мм, конечный диастолический объем 204 мл) (Таблица 13). По данным МРТ сердца – диффузный воспалительный процесс в миокарде ЛЖ. Сложилось представление о дилатационной стадии ГКМП, данных за воспалительный процесс в миокарде получено не было, была назначена терапия периндоприлом, верошпироном, метопрололом сукцинатом в максимально переносимых дозах. На этом фоне в течение 4 лет сохранялись промежуточные значения ФВ ЛЖ, нарастала масса миокарда ЛЖ, преимущественно за счет утолщения межжелудочковой перегородки (до 20 мм) (Таблица 13).

Важно отметить, что заболевание протекало на фоне курения пациента с младшего школьного возраста до 1 пачки сигарет в сутки, также известно о курении тетрагидроканнабиола в подростковом возрасте. Задержки психического развития и массо-ростовых показателей не наблюдалось. Наследственный анамнез по сердечно-сосудистой патологии не отягощен. При объективном осмотре отмечался высокий рост пациента (в возрасте 16 лет – 192 см, ИМТ в норме – 20,3 кг/м²), выраженный сколиоз грудного отдела позвоночника.

В возрасте 20 лет пациент впервые отметил появление одышки при подъеме на второй этаж. С этого момента у него регистрируется сниженная ФВ ЛЖ (18%), выраженная эксцентрическая гипертрофия ЛЖ (межжелудочковая перегородка 13 мм, задняя стенка ЛЖ 6 мм, конечный диастолический объем 390 мл) и дилатация правых камер сердца, прогрессируют явления сердечной недостаточности (уровень NT-proBNP 13 726 пг/мл) (Таблица 13), отмечаются рецидивирующие эпизоды тромбоэмболий легочной артерии, появляются эпизоды неустойчивой ЖТ, которые

послужили дополнительным аргументом в пользу имплантации кардиовертер–дефибриллятора. Пациент был включен в ЛОТС и в возрасте 21 года ему выполнена успешная трансплантация сердца.

Таблица 13 – Динамика данных эхокардиографии и значений N-терминального фрагмента мозгового натрийуретического пептида пациента Р. с гипертрофической кардиомиопатией с исходом в дилатацию камер сердца

Параметр/ Возраст	16 лет (2015)	17 лет (2016)	20 лет (2019)	21 год (2020)
BSA, м ²	2,0	2,05	2,1	1,98
ЛП, мм	43*60	52*60	54	50
Объем ЛП, мл	–	–	172	210
ИОЛП, мл/м ²	–	–	82	106
МЖП, мм	17	19	20	13
ЗС ЛЖ, мм	12	14	10	6
ИММ, г/м ²	226	221	381	192
ОТС	0,45	0,49	0,39	0,24
Геометрия ЛЖ	Концентрическая ГЛЖ	Концентрическая ГЛЖ	Эксцентрическ ая ГЛЖ	Эксцентрическая ГЛЖ
ФВ ЛЖ Simpson BP, %	47	45	23	18
КДР, мм	64	57	77	80
КСР, мм	43	42	72	–
КДО, мл	204	162	271	390
КСО, мл	–	–	210	320
УО, мл	–	–	61	25
ПП, мм	40	44*46	58*48	62*70
ПЖ 4хкам, мм	36	40	43	52
ТАPSE, мм	16	15	16	9
РСДЛА, мм рт.ст.	Норма	Норма	42	55

Клапаны	Без патологии	Без патологии	Тяжелая вторичная МР (фракция регургитации 57%, EROA 50 мм ²).	Тяжелая вторичная МР, умеренная ТР.
NT-proBNP, пг/мл	579	–	–	13 726
Примечание: ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка, ЗС ЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ИММ – индекс массы миокарда, ИОЛП – индекс объема левого предсердия, КДО – конечный диастолический объем, КДР – конечный диастолический размер, КСО – конечный систолический объем, КСР – конечный систолический размер, ЛП – левое предсердие, МЖП – межжелудочковая перегородка, МР – митральная регургитация, НПВ – нижняя полая вена, ОТС – относительная толщина стенок ЛЖ, ПП – правое предсердие, ПЖ – правый желудочек, РСДЛА – расчетное систолическое давление в легочной артерии, ТР – трикуспидальная регургитация, УО – ударный объем, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, BSA – площадь поверхности тела, TAPSE – систолическая экскурсия кольца трикуспидального клапана.				

По результатам генетического тестирования выявлен нонсенс вариант в гене *TTN* (chr2:179613376, NM_133379.5:c.13748_13751delT, rs1460696675) в гетерозиготном состоянии, приводящий к образованию сайта преждевременной терминации трансляции. По совокупности сведений, выявленный вариант нуклеотидной последовательности может расцениваться как патогенный и являться вероятной причиной заболевания. В данном клиническом примере обращают на себя внимание нетипичное проявление и ассоциация редкого варианта *TTNtv* с гипертрофическим фенотипом с исходом в дилатационную фазу заболевания, возможно, под влиянием неблагоприятного воздействия токсических факторов внешней среды.

Таким образом, среди пациентов детского возраста чаще встречаются КМП, обусловленные патогенными вариантами в гене *RBM20*, а не *TTN*, а

преобладающим фенотипом является *RBM20*-ассоциированная ДКМП. Отмечается неравномерное распределение найденных генетических вариантов в группе пациентов различного возраста. Так, среди пациентов с дебютом КМП во взрослом возрасте отмечалось больше однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* (170%) по сравнению с пациентами детского возраста (111%). Аналогичная картина наблюдается и по соотношению укорачивающих вариантов *TTN*: 2,9% – среди детей и 12,3% – среди взрослых (Таблица 14). Провести достоверное сравнение частот однонуклеотидных вариантов в гене *RBM20* между пациентами детского и взрослого возраста не представлялось возможным в связи с малым количеством обнаруженных вариантов (5).

Таблица 14 – Распределение генетических вариантов в группе пациентов с кардиомиопатиями с учетом возраста

Вариант/ Группа	Дети (n=105)	Взрослые (n=146)	p-value
<i>TTN</i> SNV	117 (111%)	248 (170%)	0,013
<i>RBM20</i> SNV	4 (3.8%)	3 (2%)	0,419
<i>TTN</i> <i>tv</i>	3 (2.9%)	18 (12,3%)	0,013
Примечание: SNV – однонуклеотидны варианты, <i>TTN</i> <i>tv</i> – укорачивающие варианты.			

В заключении можно отметить, что для КМП с дебютом заболевания в детском возрасте характерно примерно равное соотношение причинных вариантов в генах *TTN* и *RBM20*, развитие преимущественно дилатационного фенотипа и более тяжелое течение с более ранним дебютом и развитием признаков ХСН на фоне вариантов в *RBM20*. Для КМП с дебютом заболевания после 18 лет более характерна ассоциация с укорачивающими вариантами в гене *TTN* и развитием как дилатационного, так и смешанного фенотипов.

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

Для анализа влияния непатогенных вариантов в генах *TTN* и *RBM20* на клиническое течение заболевания нами была проанализирована описанная выше группа из 251 пациента: ДКМП (n=63), ГКМП (n=53), РКМП (n=72), АКМП (n=33) и НМ (n=30). В данной группе пациентов с КМП для поиска причинных вариантов было проведено генетическое исследование с применением высокопроцессивного секвенирования с использованием панели из 172 генов (Приложение 1). Наиболее часто патогенные варианты были найдены в таких генах как *MYH7*, *MYBPC3*, *SCN5A*, *LMNA*, *TNNI3*, *RYR2*, *TNNT2*, *DYS* и многих других, их анализ и связь с клиническим течением заболевания проводились вне рамок данного диссертационного исследования. В данном разделе работы был проведен 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.

При анализе вариантов в генах *TTN* и *RBM20* с частотой менее 0,1% для однонуклеотидных вариантов и менее 5% для укорачивающих вариантов суммарно было выявлено 408 генетических варианта, из них 401 в гене *TTN*, в том числе 29 укорачивающих варианта (24 нонсенс варианта, 5 делеций и инсерций со сдвигом рамки считывания) (Таблица 15). 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 значимо отличается от частоты однонуклеотидных вариантов в контрольной группе (0,151, $p < 0,001$). Также была проведена оценка патогенности однонуклеотидных вариантов *TTN* в соответствие с классификацией ACMG (Таблица 16). 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 17).

Из 401 вариантов, 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). Вышеуказанные укорачивающие варианты по классификации ACMG являлись доброкачественными и вероятно-доброкачественными, в соответствие с чем не рассматривались нами в качестве причинных вариантов в предыдущем разделе. Частота таких непатогенных укорачивающих вариантов в гене *TTN* в исследуемой группе составила 11,55%, что также значимо отличается от частоты укорачивающих вариантов в контрольной группе (2,6%, $p < 0,001$). Также нами был проанализирован показатель PSI экзонов, содержащих однонуклеотидные варианты, для групп с различными типами КМП (Таблица 18). На заключительном этапе было произведено сравнение частоты встречаемости однонуклеотидных и укорачивающих генетических вариантов среди пациентов страдающими КМП с аналогичными показателями контрольной группы (Таблица 19).

Таблица 15 – 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 варианта	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>TTNtv</i>	–	29 (11,55%)
Примечание: <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.		

Таблица 16 – Распределение однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* с частотой менее 0,1% в группе пациентов с кардиомиопатиями с точки зрения патогенности

Степень патогенности	Количество
Неопределенной значимости	131 (35,5%)
Вероятно доброкачественные	98 (26,6)
Доброкачественные	140 (37,9%)
Итого	369

Таблица 17 – 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)	НМЛЖ (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 (100%)	85 (100%)	80 (100%)	39 (100%)	51 (100%)
Среднее количество вариантов на 1 пациента	1,68	1,35	2,67	0,74	1,55
Доля пациентов с генетическими вариантами	0,69	0,67	0,6	0,66	0,4
Примечание: РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АКМП – аритмогенная кардиомиопатия.					

Таблица 18 – Среднее значение процента сплайсинга экзонов, содержащих «сопутствующие» однонуклеотидные варианты в гене *TTN* среди различных групп пациентов с кардиомиопатиями (в скобках указано количество генетических вариантов в данной группе)

Параметр/ Группа	РКМП (n=121)	ДКМП (n=85)	НМЛЖ (n=80)	ГКМП (n=39)	АКМП (n=51)
Процент сплайсинга, %	42,67	58,33	54,07	48,72	62,13
Примечание: РКМП – рестриктивная кардиомиопатия, ДКМП – дилатационная кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АКМП – аритмогенная кардиомиопатия.					

Таблица 19 – Сравнение частоты встречаемости однонуклеотидных вариантов в гене *TTN* и *RBM20*, а также укорачивающих вариантов в гене *TTN* в группе пациентов с кардиомиопатиями и контрольной группой

Параметр/ Группа	Группа пациентов с кардиомиопатиями (n=251)	Контрольная группа (n=192)	p-value
Среднее количество однонуклеотидных вариантов в гене <i>TTN</i> на одного пациента	1,45 (365)	0,15 (29)	P<0.05
Частота выявленных однонуклеотидных вариантов в гене <i>RBM20</i>	2,8% (7)	1% (2)	P>0.05
Частота укорачивающих вариантов в гене <i>TTN</i>	12,4% (31)	4,2% (8)	P<0.05

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 исследуемой группе пациентов с различными типами КМП, которые наряду с причинными мутациями способствуют

фенотипической реализации ремоделирования миокарда. Также был проведен анализ патогенности полученных вариантов по классификации ACMG, а также определен процент сплайсинга данных вариантов. 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.

3.2.8. Распределение укорачивающих вариантов по доменной структуре тайтина у пациентов с кардиомиопатиями

При анализе локализации сопутствующих укорачивающих вариантов наблюдалось их равномерное расположение по длине молекулы тайтина с относительным преобладанием в области I-зоны и центральной части A-зоны (Рисунок 29). Обращает на себя внимание существенное преобладание укорачивающих вариантов в гене *TTN* среди пациентов с различными типами КМП по сравнению с пациентами контрольной группы.

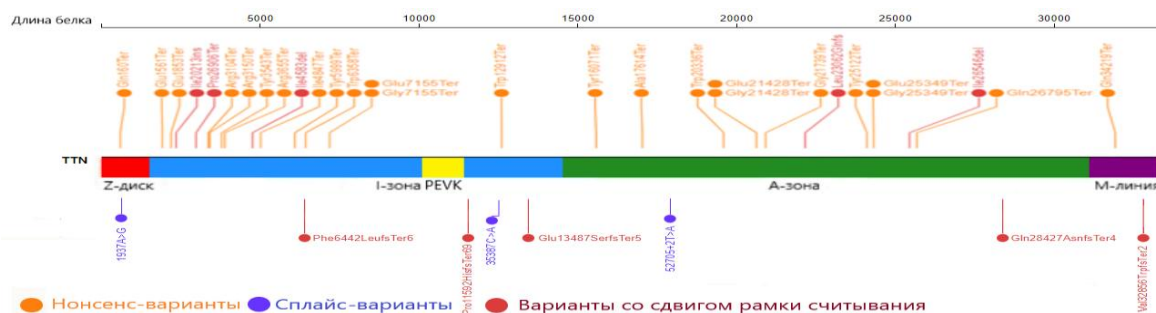


Рисунок 29 – Распределение укорачивающих вариантов по структуре белка тайтина. Сверху показано распределение в группе пациентов с кардиомиопатиями, снизу – в контрольной группе

Для оценки распределения укорачивающих вариантов *TTN* среди пациентов с различными типами КМП было также проведено сравнение полученных нами данных с данными международных когортных исследований. Опубликованные данные по укорачивающим вариантам в гене *TTN* доступны только для пациентов с ДКМП [164]. Нами показано, что локализация обнаруженных нами укорачивающих вариантов *TTN* в структуре тайтина соответствует данным международных исследований и, соответствует, преимущественной локализации в А-зоне и начальной части I-зоны (Рисунок 30).

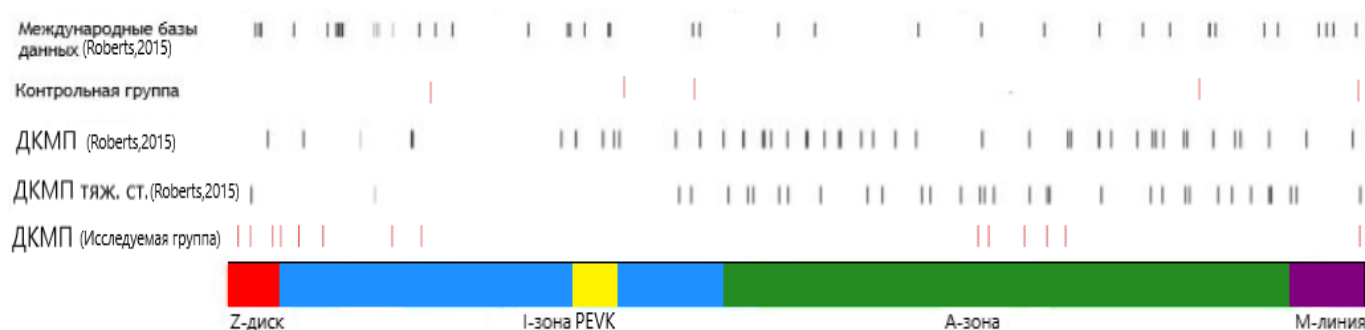


Рисунок 30 – Сравнение распределения укорачивающих вариантов в гене *TTN* по структуре транскрипта гена тайтина у пациентов контрольной группы с больными дилатационной кардиомиопатией и результатами международных исследований [164]

Примечание: В группу пациентов с дилатационной кардиомиопатией тяжелой степени были включены пациенты с установленными вспомогательными устройствами в левом предсердии и/или рекомендованные к трансплантации сердца

3.3 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. Была доказана ассоциация ХСН с вариантами в таких генах как *HSPB7*, *FRMD4B*, *BAG3*, а также большим

количеством межгенных локусов [29, 53]. Среди описанных генов, вероятно обуславливающих развитие ХСНнФВ, в ряде работ был упомянут и тайтин (*TTN*), 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. Все пациенты проходили обследование и лечение на базе центра компетенции сердечной недостаточности и в подразделениях ФГБУ НМИЦ им В. А. Алмазова. Исследуемая выборка пациентов была разделена на подгруппы в зависимости от степени снижения ФВ ЛЖ. В первую подгруппу вошли пациенты с ФВ ЛЖ более 50% с ХСНсФВ I–III ФК (n=50, 54%) и 46% (n=92) пациентов доклинической стадии сердечной недостаточности без симптомов и признаков синдрома (группа 1). Вторая подгруппа включала пациентов с ХСНунФВ I–IV ФК (ФВ от 41% до 49%) (n=142) (группа 2). В третью подгруппу составили пациенты с ХСНнФВ I–IV ФК с ФВ ЛЖ (Simpson) \leq 40% (260 пациентов) (группа 3). Диагноз ХСНсФВ выставлялся согласно современным рекомендациям [10]. Клиника ХСН I ФК оценивалась на фоне проводимой полноразмерной терапии ХСН. Критериями невключения в исследование являлись: органические поражения клапанов сердца, дилатация камер сердца вследствие болезней накопления, первичная и постмиокардитическая ДКМП, ГКМП, вторичные артериальные гипертензии, обширные операции на сердце, чрескожное коронарное вмешательство, вальвулопластика, электрофизиологическое вмешательство в пределах 12 месяцев до рандомизации, острая или

декомпенсированная СН менее чем за 3 месяца до включения в исследование. Оценка анализируемых клинических параметров проводилась в период от 6 до 24 месяцев после перенесенного ИМ.

Средний возраст пациентов всей выборки на момент обследования составил $57,4 \pm 7,4$ лет (30 – 70 лет). Основные клинические характеристики групп представлены в Таблице 20.

Таблица 20 – Клиническая характеристика пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Параметр/Группа	ХСНсФВ N=92(гр.1)	ХСНунФВ N=142(гр.2)	ХСНнФВ N=260 (гр.3)
Пол (мужчины), n (%)	92(100 %)	142(100 %)	260(100 %)
Возраст, лет	$56,5 \pm 7,6$	$60,1 \pm 6,7$	$56,4 \pm 7,5$
Минимальный/максимальный диапазон, лет	34–70	30–70	40–69
Q–инфаркт миокарда, n (%)	92(100%)	142(100%)	260(100 %)
Q–инфаркт миокарда передней стенки левого желудочка, n (%)	77(83%)	106 (75%)	223 (86 %)
Q–инфаркт миокарда нижней стенки левого желудочка, n (%)	21(23%)	40(28%)	53(20%)
Реваскуляризация миокарда, n (%)	74(80%)	103(73%)	173 (67 %)
Артериальная гипертензия в анамнезе, n (%)	76 (82,6 %)	130 (91,5 %)	178 (68 %)
Длительность артериальной гипертензии на момент исследования, лет	$10,8 \pm 8,7$	$10,7 \pm 7,9$	$11,1 \pm 10,5$
Ожирение, n (%)	24 (26,1 %)	58 (40,8 %) $p_{1,2} < 0,05$ $p_{2,3} < 0,05$	69 (26,5 %)

Сахарный диабет 2 типа, n (%)	19 (20,7 %) p _{1,2} <0,05 p _{1,3} <0,05	46 (32,3 %)	77 (29,6 %)
Фибрилляция предсердий, n (%)	19 (20,7 %) p _{1,3} <0,05	45 (31,6 %)	85 (33 %)
ПЭКС/ИКД/ СРТ–Д, n (%)	0/0/0	4(3%)/3(2%)/6(4%)	28(11%)/15(6%)/ 18(7%)
ХСН I/II/III/IV ФК (NYHA), n (%)	8(9%)/42(44%)/1(1%) 0(0%)	22(15%)/112(79%) 7(5%)/1(1%)	2(1%)/137(52%)/10 (41%)/15(6%)
NT–proBNP, пг/мл, Me[Q25;Q75]	134[38;178]	255[151;525]	
Фракция выброса ЛЖ (Simpson),% M±SD	59,3±10,4 %	44,1±6,4 %	26,95±6,3 %
Минимальный/максимальный диапазон, %	50–76 %	41–49 %	10–39 %
Конечно–диастолический размер ЛЖ, мм, Me[Q25;Q75]	53[50;56]**	57[61;53]	67[62;73]*
Конечно–диастолический объем ЛЖ, мл, Me[Q25;Q75]	133[113;154]***	169[142;193]	234[198;285]*
КДО ЛЖ/ППТ, мл/м ² , Me[Q25;Q75]	64[60;75]**	79[70;91]	116[99;147]*
Размер ЛП, мм M±SD	42,6±5,2** 43[40;45]**	47,6±6,1 48[44;51]	50,7±6,4 50[47;55]*
Объем ЛП/(рост, м) ² , мл/м ² , M±SD	24,4±8,5* 24[20;27]**	31±10,3 30[25;36]	37,9±11,9 36[30;44]*
Объем ЛП/ППТ, мл/м ² , M±SD	36,6±12* 34[30;44]**	46,4±14,9 45[38;53]	58,6±18,3 56[46;69]*
*p _{2,3} и p _{1,3} < 0,000001, **p _{1,2} < 0,0001			
Примечание: ПЭКС – постоянный электрокардиостимулятор, ЛЖ – левый желудочек, ЛП – левое предсердие, ППТ – площадь поверхности тела, КДО – конечный диастолический объем, ИКД – Имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор, NT–proBNP – N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида, СРТ-Д – устройство для сердечной ресинхронизирующей терапии с функцией имплантируемого дефибриллятора, ХСН (NYHA) – классификация выраженности хронической сердечной недостаточности Нью-Йоркской кардиологической ассоциации.			

Пациенты различных фенотипов ХСН не различались по возрасту. Все пациенты перенесли Q-инфаркт миокарда преимущественно передней стенки левого желудочка. Большинство пациентов подверглись реваскуляризации миокарда и имели клинические проявления СН II ФК. Артериальная гипертензия регистрировалась в анамнезе у большинства пациентов, при этом длительность гипертензии в различных выборках была сопоставима. У трети пациентов ХСНнФВ и ХСНунФВ диагностировался СД 2 типа. Распространенность СД 2 типа в выборке пациентов третьей группы была достоверно меньше по сравнению с другими группами и составила 21% ($p < 0,05$). Имплантированные кардиовертер-дефибрилляторы, электрокардиостимуляторы, устройства сердечной ресинхронизирующей терапии имели пациенты исключительно с ХСНнФВ и ХСНунФВ. Частота выявления ФП (пароксизмальной, постоянной, персистирующей форм) не различалась в группах с ФВ ЛЖ $< 50\%$ и составила 33% и 32% в гр.2 и гр. 3 соответственно. При этом данный вид нарушения ритма реже регистрировался у пациентов с ХСНсФВ по сравнению с пациентами ХСНнФВ ($p_{1,3} < 0,05$). Среднее значение ФВ ЛЖ, рассчитанной с использованием метода Simpson, составило $59,3 \pm 10,4\%$, $44,1 \pm 6,4\%$ и $26,95 \pm 6,3\%$ в соответствующих выборках пациентов. Закономерно, что больные ХСНнФВ имели более выраженную дилатацию полостей сердца, большие значения размеров ЛП и ЛЖ по сравнению с пациентами двух других групп.

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 этих вариантов в нарушение работы тайтина 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 21).

Таблица 21 – 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 однонуклеотидным 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 (Таблица 22).

Таблица 22 – Распределение укорачивающих вариантов в гене *TTN*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеций без сдвига рамки считывания в группе пациентов с ХСНсФВ (n=92), ХСНунФВ (n=142), ХСНнФВ (n=260) с частотой менее 5%

Ген	Тип варианта	ХСНсФВ (n=92)	ХСНунФВ (n=142)	ХСНнФВ (n=260)	ХСН (n=494)
всего <i>TTN</i> <i>tv</i>		1	0	7	8
<i>Из них</i>	Делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания	0	0	2	2
<i>Из них</i>	Нонсенс варианты	1	0	5	6
<i>TTN</i>	Делеции/инсерции без сдвига рамки считывания	11	13	18	32
<i>TTN</i>	Варианты в сайтах сплайсинга	14	19	48	81
Итого		26	32	73	131
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, <i>TTN</i> <i>tv</i> – укорачивающие варианты.					

Далее было проведено сравнение частот данных вариантов в группе пациентов с ХСН и в контрольной группе, а также между различными подгруппами пациентов с ХСН (Таблица 23). Кроме того, была создана подгруппа, объединяющая пациентов с ХСНсФВ и ХСНунФВ, для сравнения пациентов без существенного снижения ФВ с пациентами ХСНнФВ.

Таблица 23 – 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>TTN</i> <i>tv</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>TTN</i> <i>tv</i> +NF ins/del	13% (12)	9,2% (13)	10,7% (25)	9,6% (25)	10,1% (50)	5,2% (10)
<i>TTN</i> <i>tv</i> +Splice	16% (15)	13% (19)	14,5% (34)	21% (55)	16% (89)	12,5% (24)
p<0,05						

Splice+NF ins/del	27% (25)	23% (32)	24% (57)	25% (66)	25% (123)	12,5% (24)
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						
<p>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, <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.</p>						

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 частоты встречаемости инсерций и делеций без сдвига рамки считывания с использованием двустороннего критерия Фишера было выявлено достоверное различие между всеми группами пациентов с ХСН (ХСНсФВ, ХСНунФВ, ХСНс+унФВ, ХСНнФВ) и контрольной группой (11,8%, 9,2%, 10%, 6,9% и 2,6% соответственно, $p<0,05$). 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 заключение, 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 (Таблица 24).

Таблица 24 – Среднее значения процента сплайсинга генетических вариантов в гене *TTN* в подгруппах пациентов с хронической сердечной недостаточностью и сравнение с контрольной группой

Вариант/ Группа	ХСНс+унФВ	ХСНнФВ	ХСН	Контрольная группа
Однонуклеотидные варианты, (n)	80,8±35,1% (153)	66,8±32,3% (163)	73,6±33,7 (316)	67,7±41,8% (29)
<i>TTNtv</i> , (n)	5±0% (1)	72,6±46,8% (7)	64,1±49,5% (8)	52,2±48,3% (5) $p_{3,4}<0,05$
Варианты в сайтах сплайсинга, (n)	79,5±38,2% (33)	59,4±39,8% (48)	67,6±39% (81)	99,5±1,4% (8) $p_{3,4}<0,05$
Инсерции и делеции без сдвига рамки считывания, (n)	16,5±33,6% (24)	37,7±47,5% (18)	25,6±40,5% (42)	40,6±54,2% (5)
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, <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.				

Нами была выявлена достоверная разница в значении PSI *TTNtv* между подгруппами ХСН и группой контроля, в то время как для вариантов в сайтах сплайсинга, наоборот, уровень PSI выше в контрольной группе (99,5%). С учетом ранее представленных данных о значении PSI для однонуклеотидных вариантов с частотой менее 0,1% можно сделать вывод о том, что в группе пациентов с ХСН чаще определяются *TTNtv* и однонуклеотидные 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.

С целью определения вклада укорачивающих форм гена тайтина в клиническое

течение постинфарктного ремоделирования миокарда нами был проведен анализ взаимосвязи *TTNtv* с МАФ менее 5% с возможным формированием наджелудочковых нарушений ритма, в частности, с наличием ФП.

На первом этапе было проведено сравнение параметров ЛП и наличия ФП в группе ХСНнФВ между носителями *TTNtv* и вариантами в сайтах сплайсинга и пациентами без них (Таблица 25). Достоверных различий параметров ЛП между данными группами не было выявлено ($p>0,05$).

Таблица 25 – Сравнение параметров левого предсердия, фракции выброса по Симпсону и наличия фибрилляции предсердий в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в зависимости от носительства укорачивающих вариантов

Параметр/Группа	Больные ХСНнФВ с <i>TTNtv</i> и вариантами в сайтах сплайсинга (n=41)	Больные ХСНнФВ без <i>TTNtv</i> и вариантов в сайтах сплайсинга (n=219)	p-value
Размер ЛП, мм	50,3±6,3	50,7±6,4	>0,05
Объём ЛП/ППТ*, мл/м ²	57,5±19,5	58,9±18,1	>0,05
Объём ЛП/(рост, м) ² , мл/м ²	37±12,1	38±11,9	>0,05
Фибрилляция предсердий, n (%)	15 (36,6)	74 (33,8)	>0,05
Фракция выброса ЛЖ (Simpson), %	26,6±6,8	26,9±6,2	–
Примечание: ХСНнФВ - хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса, ЛП – левое предсердие, ППТ – площадь поверхности тела, ЛЖ – левый желудочек, <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.			

Далее было проведено аналогичное сравнение в подгруппе пациентов с сохраненной и умеренно низкой ФВ, в результате которого также достоверных различий в параметрах ЛП и частоте ФП выявлено не было (Таблица 26).

Таблица 26 – Сравнение параметров левого предсердия, наличия фибрилляции и фракции выброса по Симпсону предсердий в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса в зависимости от носительства укорачивающих вариантов в гене *TTN*

Параметр/Группа	Больные ХСНс+унФВ с <i>TTNtv</i> и вариантами в сайтах сплайсинга (n=23)	Больные ХСНс+унФВ без <i>TTNtv</i> и вариантов в сайтах сплайсинга (n=211)	p-value
Размер ЛП, мм	46,3±4,2	45,6±6,2	>0,05
Объём ЛП/ППТ*, мл/м ²	50,1±4,8	43,4±12,4	>0,05
Объём ЛП/(рост, м) ² , мл/м ²	34,6±5,1	28,9±8,8	>0,05
Фибрилляция предсердий, n (%)	4 (17,3)	60 (28,4)	>0,05
Фракция выброса ЛЖ (Simpson), %	51,5±9,8	49,9±11	–
Примечание: ХСНс+унФВ - хроническая сердечная недостаточность с сохраненной и умеренно низкой фракцией выброса, ЛП – левое предсердие, ППТ – площадь поверхности тела, ЛЖ – левый желудочек, <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.			

Далее было проведено сравнение внутри всей группы пациентов с ХСН на предмет возможного наличия ассоциации между *TTNtv* и вариантами в сайтах сплайсинга, морфо–функциональными параметрами ЛП и наличием ФП (Таблица 27). Достоверного различия 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. Различия в возрастных характеристиках, в частоте встречаемости кардиометаболических факторов, ассоциируемых с развитием ФП в исследуемых группах, и частоте встречаемости самих *TTNtv* и вариантов в сайтах сплайсинга могут частично объяснять отсутствие ассоциаций

между укорачивающими формами тайтина, параметрами ЛП и факта изучаемого нарушения ритма.

Таблица 27 – Сравнение параметров левого предсердия, наличия фибрилляции предсердий и фракции выброса по Симпсону и в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью в зависимости от носительства укорачивающих вариантов в гене *TTN*

Параметр/Группа	Больные ХСН с <i>TTN</i> tv и вариантами в сайтах сплайсинга (n=64)	Больные ХСН без <i>TTN</i> tv и вариантов в сайтах сплайсинга (n=430)	p-value
Размер ЛП, мм	48,9±6,8	48,2±6,7	>0,05
Объём ЛП/ППТ*, мл/м ²	55,9±23,2	51,7±17,7	>0,05
Объём ЛП/(рост, м) ² , мл/м ²	36,5±14,8	33,8±11,5	>0,05
Фибрилляция предсердий, n (%)	19 (29,7)	134 (31,2)	>0,05
Фракция выброса ЛЖ (Simpson), %	35,5±14,2	38,1±14,2	–
Примечание: ХСН - хроническая сердечная недостаточность, ЛП – левое предсердие, ППТ – площадь поверхности тела, ЛЖ – левый желудочек, <i>TTN</i> tv – укорачивающие варианты.			

Влияние полиморфных вариантов в различных генах саркомера на развитие и течение ССЗ общеизвестно, а в последние годы в связи с развитием методов молекулярно-генетической диагностики, секвенирования нового поколения и доступностью данных GWAS масштаб и информативность подобных исследований многократно увеличились. В частности, было выявлено множество генетических вариантов, ассоциированных с развитием или неблагоприятным течением ХСН, в частности, в таких генах как *TNNT2*, *THBS2*, *FBLN3*, *TFF3*, генах, кодирующих ионные каналы и структурные белки саркомера [37]. В связи с этим в данной работе мы оценили возможную связь полиморфных вариантов гена *RBM20* с структурно-

функциональным ремоделированием миокарда у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом, включая ассоциации с наличием ФП.

На первом этапе работы была проведена оценка частоты встречаемости минорных аллелей двух полиморфных вариантов в гене *RBM20* (rs942077 и rs35141404), для которых была доказана ассоциация с развитием ФП [161] (Таблица 28).

Таблица 28 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в подгруппах пациентов с хронической сердечной недостаточностью, в контрольной группе и согласно базам данных

Полиморфизм/ Группа		ХСНнФВ (n=260)	ХСНс+унФ В (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 А 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, в данной работе нами была показана ассоциация аллеля G rs942077 и аллеля A rs35141404 с развитием ХСН в группе жителей Санкт-Петербурга.

В качестве одной из клинических характеристик, усугубляющих течение ХСН, нами была рассмотрена ФП и проведен анализ связи полиморфных вариантов в гене *RBM20* с развитием данного нарушения ритма [146]. Результаты были получены в ходе биоинформатического анализа данных высокопроцессивного секвенирования. Различия в распространенности минорных аллелей данных вариантов в зависимости от наличия ФП у пациентов с ХСНнФВ отсутствовали (Таблица 29).

Таблица 29 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в группах пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий, в контрольной группе и согласно различным базам данных

Полиморфизм/ Группа		ХСНнФВ с ФП (n=85)	ХСНнФВ без ФП (n=175)	ХСНнФВ (n=260)	Контрольная группа (n=192)	GnomAd/RUSeq/ BioBank Russia
rs942077	C	91,7% (156)	91,4% (320)	91,2% (474)	88,5% (340)	86,7%/89,4%/89%
	G	8,3% (16)	8,6% (30)	8,8% (46)	11,5% (44)	13,3%/10,6%/11%
rs35141404	G	78,8% (134)	84% (294)	82,3% (428)	90% (345)	85,1%/88,4%/88%
	A	21,2% (36)	16% (56)	17,7% (92)	10% (37)	14,9%/11,6%/12%
p<0,05						
Примечание: ФП – фибрилляция предсердий, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса.						

Стоит отметить, что наибольшая частота, хоть и не достигшая порога значимости минорного аллеля A rs35141404 регистрировалась в подгруппе с ФП,

имеющей более длительный стаж артериальной гипертензии, встречаемость СД 2 типа и ожидаемое большее ремоделирование ЛП и ФК ХСН по сравнению с группой без ФП. Клиническая характеристика пациентов с ХСНнФВ в зависимости от наличия ФП представлена в Таблице 30.

Таблица 30 – Клинические характеристики пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий

Параметр/Группа	ХСНнФВ с ФП (n=85)	ХСНнФВ без ФП (n=175)
Возраст, лет, Ме [Q25;Q75]	59[54;62]	56[51;62]
АГ, % (n)	70(59)	67(118)
Длительность АГ, лет, Ме [Q25;Q75]	15[0;17]	7[0;15] p<0,05
Ожирение, % (n)	29(25)	21(36)
Сахарный диабет,% (n)	38(32)	25(44) p<0,05
ФК ХСН, Ме [Q25;Q75]	3[2;3]	2[2;3] p=0,0008
ФВ ЛЖ, %, Ме [Q25;Q75]	25[22;30]	28[22;32]
Размер ЛП, мм, Ме [Q25;Q75]	53[49;56]	49[46;52] p<0,05
Объём ЛП/ППТ, мл/м ² , Ме [Q25;Q75]	65[54;75]	54[43;64] p<0,05
Примечание: АГ – артериальная гипертензия, ФП – фибрилляция предсердий, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ППТ – площадь поверхности тела, ЛП – левое предсердие, ХСНнФВ – хроническая сердечная недостаточность со сниженной фракцией выброса.		

У пациентов с ХСНнФВ наблюдалась достоверная разница в частоте встречаемости минорного аллеля G rs942077 независимо от наличия ФП по сравнению с группой контроля. Стоит отметить, что наибольшая частота, минорного аллеля G rs942077 регистрировалась в подгруппе с ФП, имеющей более длительный

стаж артериальной гипертензии, встречаемость СД 2 типа и ожидаемое большее ремоделирование ЛП и ФК ХСН по сравнению с группой без ФП (Таблица 31). Клиническая характеристика пациентов с ХСНсФВ и ХСНунФВ в зависимости от наличия ФП представлены в Таблице 32.

Таблица 31 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в группах пациентов с хронической сердечной недостаточностью с умеренно сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий, в контрольной группе и согласно базам данных

Полиморфизм/ Группа		ХСНунФВ с ФП (n=45)	ХСНунФВ без ФП (n=97)	ХСНунФВ (n=142)	Контрольная группа (n=192)	GnomAd/RUSeq/ BioBank Russia
rs942077	C	89,9% (80)	95,1% (185)	93,3% (265)	88,5% (340)	86,7%/89,4%/89%
	G	11,1% (10)	4,9% (9) p=0,06	6,7% (19)	11,5% (44) p<0,05	13,3%/10,6%/11%
rs35141404	G	93,3% (84)	86,7% (169)	89,1% (253)	90% (345)	85,1%/88,4%/88%
	A	6,7% (6)	13,6% (25)	10,9% (31)	10% (37)	14,9%/11,6%/12%
Примечание: ХСНунФВ – хроническая сердечная недостаточность с умеренно сниженной фракцией выброса.						

Таблица 32 – Клинические характеристики пациентов с хронической сердечной недостаточностью с умеренно сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий

Параметр/Группа	ХСНунФВ с ФП (n=45)	ХСНунФВ без ФП (n=97)
Возраст, лет, Ме [Q25;Q75]	63[59;65]	60[57;64]
АГ, % (n)	96(43)	90(87)
Длительность АГ, лет, Ме [Q25;Q75]	15[9;18]	11[2;15]
Ожирение, % (n)	40(18)	40(39)
Сахарный диабет,% (n)	36(16)	31(30)
ФВ ЛЖ, %, Ме [Q25;Q75]	43[41;45]	44[42;48]
Размер ЛП, мм, Ме [Q25;Q75]	51[47;55]	46[42;49] p<0,05
Объём ЛП/ППТ, мл/м ² , Ме [Q25;Q75]	51[45;61]	42 [37;48] p<0,05
Примечание: ХСНунФВ – хроническая сердечная недостаточность с умеренно сниженной фракцией выброса, АГ – артериальная гипертензия, ФП – фибрилляция предсердий, ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ППТ – площадь поверхности тела, ЛП – левое предсердие.		

У пациентов с ХСНсФВ наибольшая частота регистрировалась для обеих минорных аллелей в подгруппе с ФП, имеющей более длительный стаж артериальной гипертензии, встречаемость СД2 и ФК ХСН по сравнению с референтной группой без ФП (Таблица 33). Клиническая характеристика пациентов с ХСНсФВ и ХСНунФВ в зависимости от наличия ФП представлены в Таблице 34.

Таблица 33 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в группах пациентов с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий, в контрольной группе и согласно различным базам данных

Полиморфизм/ Группа		ХСНсФВ с ФП (n=19)	ХСНсФВ без ФП (n=73)	ХСНсФВ (n=92)	Контрольная группа (n=192)	GnomAd/RUSeq/ BioBank Russia
rs942077	C	89,5% (34)	95,9% (140)	94,6% (174)	88,5% (340)	86,7%/89,4%/89%
	G	10,5% (4)	4,1% (6)	5,4% (10)	11,5% (44)	13,3%/10,6%/11%
					$P_{3,4} < 0,05$	
rs35141404	G	79% (30)	89,9% (130)	87% (160)	90,3% (347)	85,1%/88,4%/88%
	A	21% (8)	10,1% (16)	13% (24)	9,7% (37)	14,9%/11,6%/12%
Примечание: ФП – фибрилляция предсердий, ХСНсФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса.						

Таблица 34 – Клинические характеристики пациентов с хронической сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса в зависимости от наличия фибрилляции предсердий

Параметр/Группа	ХСНсФВ с ФП (n=19)	ХСНсФВ без ФП (n=73)
Возраст, лет, Ме [Q25;Q75]	62[59;66]	55[52;60]
АГ, % (n)	84(16)	82(80)
Длительность АГ, лет, Ме [Q25;Q75]	12[8;15]	11[3;15]
Ожирение, % (n)	21(4)	27(20)
Сахарный диабет,% (n)	26(5)	19(14)
ФВ ЛЖ, %, Ме [Q25;Q75]	60[57;63]	57[55;64]
Размер ЛП, мм, Ме [Q25;Q75]	42[40;45]	42[40;45]
Объём ЛП/ППТ, мл/м ² , Ме [Q25;Q75]	34[31;40]	34[31;40]
Примечание: ФП – фибрилляция предсердий, ХСНсФВ – хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса, АГ – артериальная гипертензия, , ФВ ЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ППТ – площадь поверхности тела, ЛП – левое предсердие.		

При объединении двух вышеуказанных подгрупп достоверная разница в частоте встречаемости вышеуказанных полиморфизмов гена *RBM20* между пациентами с ФП и без нее отсутствовала ($p > 0,05$) (Таблица 35).

Таблица 35 – Распределение аллелей полиморфных вариантов rs942077 и rs35141404 гена *RBM20* в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью в зависимости от наличия фибрилляции предсердий, в контрольной группе и согласно различным базам данных

Полиморфизм/ Группа		ХСН с ФП (n=149)	ХСН без ФП (n=345)	Контрольная группа (n=192)	GnomAd/RUSeq/ BioBank Russia
rs942077	C	92,4% (275)	93,3% (640)	88,5% (340)	86,7%/89,4%/89%
	G	7,6% (23)	6,7% (46)	11,5% (44)	13,3%/10,6%/11%
			$p_{1,2} > 0,05$		
rs35141404	G	81,2% (242)	84,6% (584)	90,3% (347)	85,1%/88,4%/88%
	A	18,8% (56)	15,4% (106)	9,7% (37)	14,9%/11,6%/12%
			$p_{1,2} > 0,05$		
Примечание: ФП – фибрилляция предсердий, ХСН – хроническая сердечная недостаточность.					

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. В частности аллель G полиморфизма rs942077 был ассоциирован с развитием низкой фракции выброса у пациентов с ХСН. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о наличии влияния *TTNtv* и полиморфных вариантов в гене *RBM20* на развитие и течение ХСН у пациентов с ПИКС, то есть на формирование систолической дисфункции и эксцентрического ремоделирования

миокарда, но при этом отсутствии влияния *TTNtv* на формирование нарушений сердечного ритма.

3.3.1 Распределение патогенных вариантов по доменной структуре тайтина у пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Далее была произведена оценка распределения генетических вариантов (*TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеции без сдвига рамки считывания) по структуре транскрипта гена тайтина и проведено сравнение двух групп (ХСНнФВ и ХСНс+унФВ), в результате чего было обнаружено, что у пациентов без существенного снижения ФВ генетические варианты сосредоточены преимущественно в I-зоне, в отличие от пациентов со сниженной ФВ, у которых наблюдается равномерное распределение вариантов по структуре транскрипта гена тайтина и более высокая по сравнению с контрольной группой частота встречаемости укорачивающих вариантов в A-зоне, области M-линии и Z-линии (Рисунок 31).

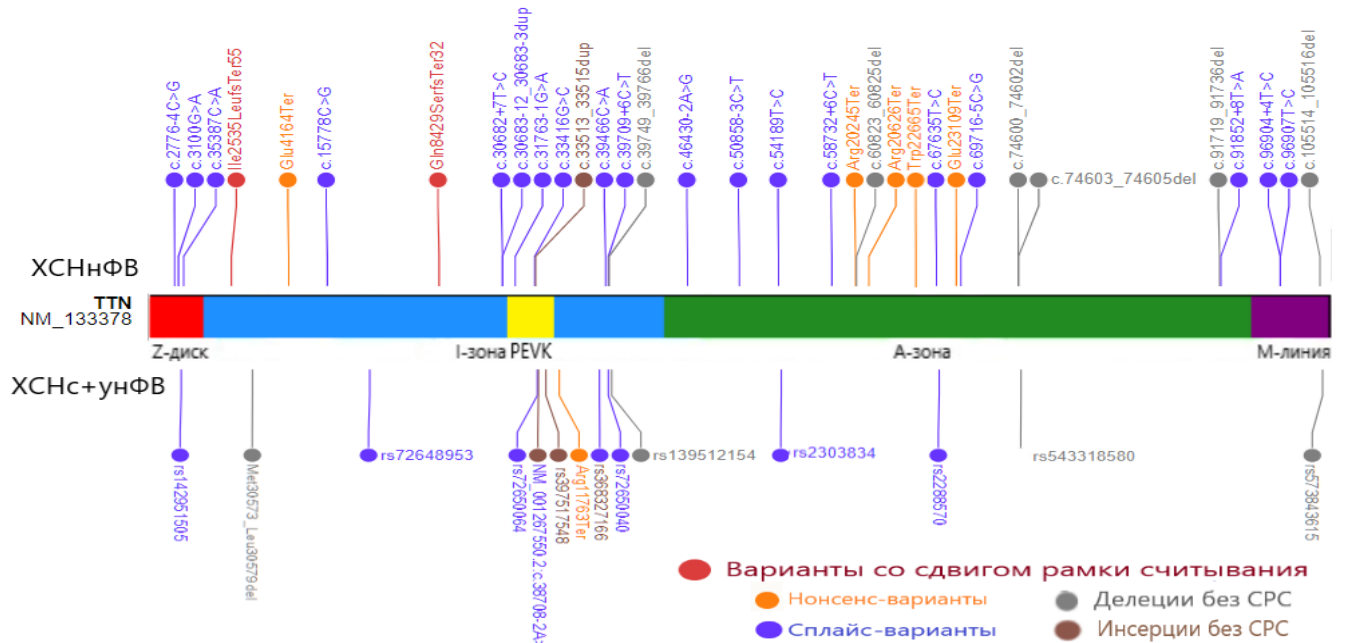


Рисунок 31 – Сравнение распределения укорачивающих вариантов в гене *TTN*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеции без сдвига рамки считывания по структуре тайтина в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса и у пациентов без существенного снижения фракции выброса

3.3.2 Влияние укорачивающих вариантов в гене *TTN* и полиморфных вариантов в гене *RBM20* на вероятность 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 36) а сочетание *TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга и аллеля *C rs942077* в 1,34 раза.

Таблица 36 – Относительный риск встречаемости хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью при наличии укорачивающих вариантов в гене *TTN* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга *TTN* и укорачивающие варианты в гене *TTN* в сочетании с вариантами в сайтах сплайсинга *TTN* и полиморфным вариантом в гене *RBM20*

Группа/ Варианты	Есть <i>TTNtv+splice</i>	Нет <i>TTNtv+splice</i>
ХСНнФВ	41	219
ХСНс+унФВ	23	211
ОР- 1,24 (95% ДИ = 1,024-1,454)		
	Есть <i>TTNtv+splice</i> + <i>rs942077</i> (аллель С)	Нет <i>TTNtv+splice</i> + <i>rs942077</i> (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> , <i>splice</i> – 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 $\leq 35\%$ в когорте больных с постинфарктным кардиосклерозом и ХСН, имеющих *TTNtv*, увеличивается в два раза (ОР – 1,86 (95% ДИ =1,406-2,453).

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 хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса в группе пациентов, перенесших инфаркт миокарда (Рисунок 32).

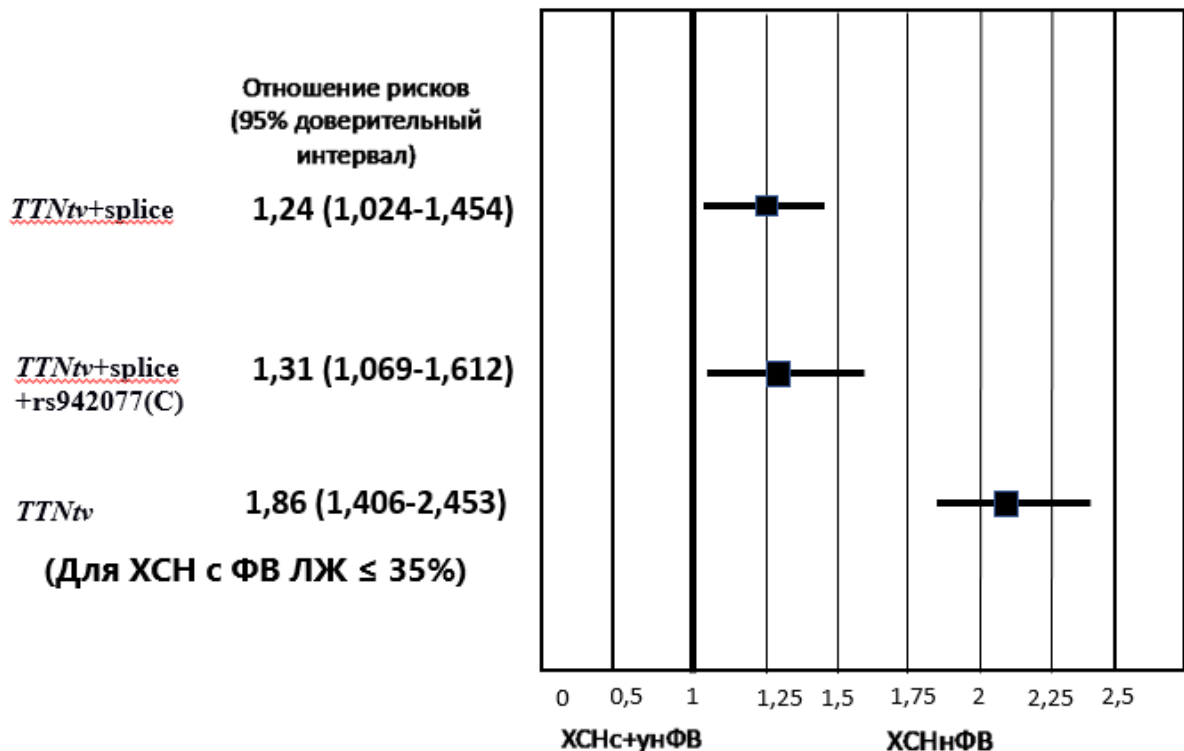


Рисунок 32 – Риск развития хронической сердечной недостаточности со сниженной фракцией выброса в зависимости от наличия вариантов в генах *TTN* и *RBM20*

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

3.4 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 [13, 79, 163]. После выявления всех вариантов в контрольной и исследуемой группах, была проведена оценка их локализации с учетом таких критериев как уровень PSI экзона и локализация в соответствие с доменной структурой тайтина. На первом этапе было проведено распределение выявленных укорачивающих вариантов в доменной структуре тайтина (Таблица 37). Статистически значимого различия в распределении вариантов в контрольной и исследуемых группах выявить не удалось, вероятнее всего вследствие малого количества укорачивающих вариантов. Несмотря на это полученные значения наглядно демонстрируют определенную тенденцию: в частности, наблюдается относительно высокая доля вариантов в I-зоне, экзонах в которой часто имеют низкий уровень PSI, у лиц контрольной группы (60%) по сравнению с группами пациентов с ХСНнФВ и пациентами с КМП (43% и 51,7% соответственно). Кроме того, аналогичная картина наблюдается в отношении *TTNtv*, локализованных в А-зоне: относительно низкая доля данных вариантов наблюдается в контрольной группе (20%) по сравнению с аналогичным показателем в группах пациентов с ХСНнФВ и больными КМП (57% и 41,5% соответственно).

Таблица 37 – 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 значения PSI для экзонов, содержащих выявленные генетические варианты (Таблица 38). Было выявлено достоверное различие в уровне PSI экзонов, содержащих *TTN*tv 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 38 – Уровень процента сплайсинга 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, <i>TTNtv</i> – укорачивающие варианты.				

На заключительном этапе было произведено сравнение распределения *TTNtv*, вариантов в сайтах сплайсинга, инсерций и делеции без сдвига рамки считывания по структуре транскрипта гена *TTN* у пациентов всех исследуемых групп (Рисунок 33). Стоит отметить, что у пациентов с ХСНс+унФВ значительная часть вариантов располагается в областях 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мутации в гене *TTN*, а также *RBM20*, кодирующем его фактор сплайсинга, приводят к снижению устойчивости структуры и неправильному формированию саркомера, а также аномальной сборке миофибрилл. Из-за широкого спектра функций тайтина и его присутствия как в кардиомиоцитах, так и в поперечно-полосатых мышечных клетках, мутации в гене *TTN* приводят к различным заболеваниям миокарда и скелетной мускулатуры. Используемый в данной работе метод поиска вариантов в гене *TTN* и *RBM20* основан на технологии высокопроцессивного секвенирования, появление которой имеет для изучения данного гена ключевое значение, так как позволяет осуществлять молекулярно-генетическое исследование столь большого по размерам гена у большого числа пациентов с дальнейшей оценкой патогенности и частоты обнаруженных вариантов. Так, например, появление данной технологии позволило пересмотреть причинную значимость некоторых ранее обнаруженных вариантов, выявленных методом секвенирования по Сэнгеру, которые ранее рассматривались как причинные, а в настоящее время считаются доброкачественным полиморфизмами [109]. Данная работа посвящена изучению влияния вариантов в гене *TTN* и *RBM20* различной степени патогенности и функциональной значимости на развитие врожденной и приобретенной патологии миокарда. Нами были проанализированы особенности клинического течения КМП с патогенными, вероятно-патогенными и вариантами неопределенной значимости в генах *TTN* и *RBM20*. В дополнение нами был оценен вклад вариантов в данных генах в формирование и течение полигенных заболеваний сердечно-сосудистой системы на примере ХСН ишемической этиологии.

Используемый нами критерий отбора укорачивающих вариантов (*TTNtv*), а также вариантов в сайтах сплайсинга и NF ins/del по частоте (менее 5%) обусловлен отсутствием вариантов с частотой более 5%, которые были описаны как патогенные или могли бы доказано быть ассоциированы с развитием сердечно-сосудистой

патологии. В тоже время актуальность дальнейшего анализа и этой группы генетических вариантов очевидна, так как они могут выступать в качестве модификаторов при наличии других причинных вариантов. Кроме того, в недавней работе Андреевой с соавт., вышедшей в 2022 году было показано, что у пациентов с КМП зачастую наблюдается амилоидное поражение миокарда по данным сцинтиграфии с положительной на амилоид морфологической окраской (Конго красный, Сириус красный), при этом известные кардиальные формы амилоидоза (ATTR- или AL-амилоидоз) у них исключены. Одной из причин формирования амилоидных фибрилл являются укорачивающие варианты в гене *TTN*, нарушающие фолдинг и агрегацию одноименного белка за счет раскрытия амилоидогенных последовательностей, в норме скрытых в 3D-структурах доменов [2].

После проведения высокопроцессивного секвенирования пациентов контрольной группы и получения данных о частоте и спектре вариантов в *TTN* и *RBM20* в группе жителей Санкт-Петербурга было принято решение установить критерий отбора по частоте для *TTN**tv* вариантов на уровне 5%, а для однонуклеотидных вариантов на уровне 0,1%, в расчете на то, что обозначенный спектр будет достаточно полно отражать распределение генетических вариантов, потенциально влияющих на развитие сердечно–сосудистой патологии (Таблица 39).

Таблица 39 – Сравнение процентного распределения генетических вариантов в контрольной группе (общее количество, с частотой менее 5%, с частотой менее 0,1%)

Ген	Тип варианта	Общее количество	Кол–во с частотой менее 5%	Кол–во с частотой менее 0,1%
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные варианты	3356 (97,7%)	418 (95,9%)	29 (76,3%)
<i>TTN</i>	Делеции/инсерции без сдвига рамки считывания	5 (0,15%)	5 (1,1%)	1 (2,6%)
<i>TTN</i>	Варианты в сайтах сплайсинга	69 (2%)	8 (1,9%)	3 (7,9%)
<i>TTN</i>	Укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i>	5 (0,15%)	5 (1,1%)	5 (13,2%)
<i>TTN</i>	Итого	3435 (100%)	436 (100%)	38 (100%)

Таким образом, при снижении частоты встречаемости вариантов в качестве критерия отбора наблюдается относительное увеличение доли *TTN**tv*, вариантов в сайтах сплайсинга, а также инсерций и делеций без сдвига рамки считывания с падением доли однонуклеотидных вариантов. При этом стоит отметить, что доля вариантов в сайтах сплайсинга примерно одинакова (2% и 1,9%) как при учете всех вариантов, так и при частоте менее 5%.

В большинстве опубликованных международных исследованиях с использованием данных многоцентровых научных консорциумов при анализе причинных вариантов в отношении генетически-обусловленных заболеваний учитываются только редкие варианты (то есть с частотой встречаемости менее 0,1%). Таким образом, для проведения сравнительного анализа частот вариантов в гене *TTN* данный показатель (0,1%) является достаточным и информативным. При сравнении полученных нами данных с данными, опубликованными в международных базах данных и полученных для других популяций было выявлено

сходное распределение выявленных вариантов по типу мутаций. Однако стоит отметить большую долю вариантов в сайтах сплайсинга и меньшую частоту встречаемости делеций и инсерций без сдвига рамки считывания в данных международных исследований (Таблица 40). Разница в частоте встречаемости инсерций и делеций без сдвига рамки считывания наиболее вероятно связана со сложностью биоинформатической интерпретации данного типа вариантов, которые зачастую недостаточно корректно распознаются и считываются при автоматическом прочтении последовательности гена в процессе анализа данных секвенирования нового поколения. При учете вариантов в сайтах сплайсинга также вероятны вышеуказанные причины расхождения, в дополнение к которым стоит учитывать, что определение распространенности сайта сплайсинга (± 3 нуклеотида, ± 5 нуклеотидов, ± 8 нуклеотидов) также может отличаться при применении различных биоинформатических алгоритмов анализа, в результате чего данные частот сплайс-вариантов могут существенно варьировать.

Таблица 40 – Сравнение процентного распределения генетических вариантов (с частотой менее 0,1%) в контрольной группе с данными международных исследований и RUSeq

Ген	Тип варианта	Контрольная группа	База данных GnomAd	База данных RUSeq
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные варианты	29 (76,3%)	8265 (71,4%)	2377 (83,9%)
<i>TTN</i>	Делеция/инсерция без сдвига рамки считывания	1 (2,6%)	82 (0,7%)	41 (1,4%)
<i>TTN</i>	Варианты в сайтах сплайсинга	3 (7,9%)	1585 (13,7%)	265 (9,4%)
<i>TTN</i>	Укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i>	5 (13,2%)	1640 (14,2%)	151 (5,3%)
<i>TTN</i>	Итого	38 (100%)	11572 (100%)	2834 (100%)

Стоит отметить, что 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 контрольной группы для оценки вариантов в генах *TTN* и *RBM20* (Таблица 41).

Таблица 41 – Сравнение частоты генетических вариантов в контрольной группе с частотой менее 0,1% с данными международных исследований

Ген	Тип варианта	Частота в контрольной группе (n=192))	Частота согласно данным GnomAd	Частота согласно данным RUSeq
<i>TTN</i>	Однонуклеотидные варианты	15,1%	16,5%	30,9%
<i>TTN</i>	Делеция/инсерция без сдвига рамки считывания	0,5%	0,15%	2%
<i>TTN</i>	Варианты в сайтах сплайсинга	1,6%	2%	2,8%
<i>TTN</i>	Укорачивающие варианты в гене <i>TTN</i>	2,6%	3%	1,5%

Высокая патогенность вариантов в А–зоне молекулы тайтина была подтверждена в ряде исследований, при этом в общей популяции варианты в данной области встречаются относительно редко в отличие от вариантов в I–зоне [42]. Согласно данным, опубликованным Akinrinade и соавт., наличие *TTNtv* в области А–зоны или дистального участка I–зоны с вероятностью 98% приводит к формированию фенотипа ДКМП [14]. Кроме того, по данным тех же исследователей патогенные однонуклеотидных варианты наиболее часто (69%) встречаются именно в этой области молекулы тайтина [15]. Высокая вовлеченность данной области тайтина в патологический процесс обусловлена еще и тем, что почти все экзоны в А–зоне имеют 100% уровень PSI.

При этом при учете однонуклеотидных вариантов с показателем CADD (combined annotation dependent depletion - инструмент для вычисления патогенности

удаления единичного нуклеотида из структуры гена) более 20, картина распределения по структуре транскрипта гена становится более равномерной, в первую очередь за счет элиминации большого числа менее функционально значимых вариантов в I–зоне молекулы (Рисунок 34).

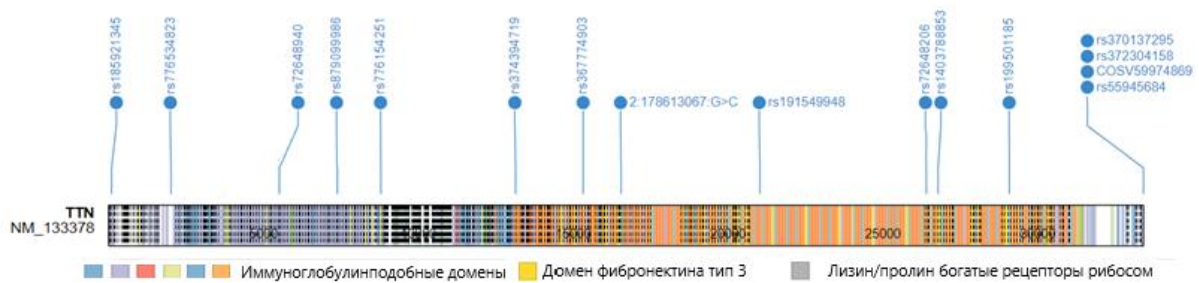


Рисунок 34 – Распределение однонуклеотидных вариантов с индексом патогенности удаления единичного нуклеотида из структуры гена более 20 в контрольной группе (с частотой менее 0,1%) по доменной структуре гена тайтина

Установленная нами частота *TTNtv* в контрольной группе сопоставима с данными большинства зарубежных исследований [192]. Первое исследование *TTNtv* было проведено в 2012 Нерман и соавт., по итогам которого частота *TTNtv* в популяции составила 3% [80]. В 2015 году Робертс с соавт., используя базу данных 1000 Genomes и Exon Sequencing Projects, установили среднюю частоту *TTNtv* в контрольной популяции на уровне 2% [164]. В исследовании 2015 года Akinrinade с соавт. было показано, что частота *TTNtv*, присутствующих во всех транскриптах, согласно базе данных ExAC составляет 0,36%, при этом *TTNtv*, локализованные в А–зоне тайтина наиболее пенетрантны [13, 79, 163]. К сожалению, в нашем исследовании размер контрольной группы (192 человека) недостаточен для полномасштабной оценки частоты *TTNtv*, однако, полученные на группе жителей Санкт-Петербурга пилотные данные, в целом, свидетельствуют о соответствии данным, опубликованным по результатам вышеперечисленных международных исследований.

В отношении укорачивающих вариантов обращает на себя внимание существенная разница в среднем уровне PSI для экзонов с *TTN*_{tv} 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. Возможно, альтернативный сплайсинг экзонов тайтина является одним из механизмов, повышающих способность миокарда к гемодинамической и стрессовой адаптации. Альтернативно, изменение и ограничение возможности сплайсинга *TTN* может препятствовать неблагоприятному ремоделированию кардиомиоцитов в ответ на избыточные гемодинамические нагрузки. В доступной для изучения литературе на сегодня не существует экспериментального и фундаментального подтверждений данным гипотезам. 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. Стоит отметить, что в отношении многих детектированных нами вариантов отсутствует информация по частоте встречаемости и *rs*, так как они являются впервые описанными. Это еще раз подчеркивает большую вариабельность гена *TTN*, которая обуславливает наличие у многих пациентов уникальных вариантов и их сочетаний, что во многом может определять фенотип основного заболевания. 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 [41]. С учетом важности данного гена для сплайсинга не только тайтина, но и множества других генов саркомера и ионных каналов [69], полученные данные являются крайне актуальными для анализа

последующих генотип-фенотипических взаимодействий у пациентов с различными врожденными и приобретенными заболеваниями сердечно-сосудистой системы.

Сложность секвенирования гена *TTN* из-за его большого размера долгое время оставалась препятствием для изучения его ассоциации с развитием различных кардиомиопатий. Однако на сегодняшний день внедрение секвенирования нового поколения позволило доказать влияние вариантов в гене *TTN* на формирование всех типов КМП [24, 149, 185]. Единственным исключением является ГКМП, для которой характерен более низкий уровень *TTNtv* по сравнению с другими типами КМП. По мнению ряда исследователей, данные *TTNtv* варианты являются преимущественно модулирующим фактором, а не его первичной причиной развития ГКМП [4, 57, 78]. При этом тайтин-укорачивающие мутации вносят решающий вклад в развитие ДКМП, являясь наиболее частой причиной развития данной патологии (примерно в 20–25% случаев) [112]. Кроме того, согласно исследованиям Patel и соавт. в 2021 году варианты неопределенной значимости в сайтах сплайсинга являются причиной развития 1-2% всех случаев ДКМП [147]

Для оценки роли вариантов в генах *TTN* и *RBM20* в качестве основных причинных, а также сопутствующих («сопутствующих») факторов развития КМП была исследована группа пациентов с различными вариантами КМП, в частности с ДКМП (n=63), ГКМП (n=53), РКМП (n=72), АКМП (n=33) и НМ (n=30). Из 251 пациента данной группы 105 составляли пациенты детского возраста. При анализе причинных вариантов, вызвавших развитие различных типов КМП, обращает на себя внимание большая доля пациентов с ДКМП, что довольно предсказуемо, так как варианты в гене *TTN* (в первую очередь *TTNtv*) являются причиной развития данной патологии примерно в 20-30% случаев [68, 153, 163]. На первом этапе нами был проведен анализ вариантов в *TTN* и *RBM20*, которые в соответствии с рекомендациями Американской коллегии медицинской генетики рассматривались в качестве причинных или имеющих непосредственное отношение к развитию кардиального фенотипа пациента [162]. Ожидаемо, в исследуемой нами когорте

пациенты с ДКМП и дилатационным фенотипом составили больше половины всех случаев КМП, ассоциированной с вариантами в *TTN* (13 из 24). Идентификация вариантов в гене *TTN* в качестве причины развития ДКМП имеет важное клиническое значение, поскольку согласно недавним исследованиям пациенты с ДКМП, вызванной мутациями в *TTN* имеют наиболее высокий процент обратного ремоделирования миокарда при условии оптимальной медикаментозной терапии в отличии, например, от пациентов с ДКМП, ассоциированной мутациями в гене *MYH7* [47, 190]. В то же время именно в данной группе пациентов наблюдается наиболее высокая частота развития ФП, что с учетом более поздней манифестации *TTN*-ассоциированной ДКМП зачастую на фоне коморбидных состояний – ожирения, диабета, артериальная гипертензия – также имеет важное клиническое значение [30]. Вклад вариантов в *TTN* в развитие ФП был неоднократно показан как в полногеномных исследованиях для однонуклеотидных замен, так и для *TTNtv* [89, 198] [151]. Сходным образом варианты в гене *TTN* были ассоциированы и с идиопатическими генетически-обусловленными формами ФП [150, 165]. В исследуемой нами выборке пациентов с КМП количество пациентов с *TTN*-ассоциированными формами было недостаточно для проведения углубленного анализа ассоциаций вариантов *TTN* с развитием ФП. Однако, в последующем по мере расширения группы проведение данного анализа представляется целесообразным, особенно для выделения группы пациентов с наибольшими рисками развития ФП на фоне различных форм КМП.

По результатам проведенного нами анализа наиболее редко варианты в гене *TTN* могут рассматриваться в качестве причины ГКМП. Единичные сообщения относительно причинной роли однонуклеотидных вариантов в *TTN*, которые рассматривали в качестве причины ГКМП датированы 1999-2015 и на сегодняшний момент не достаточно свидетельств того, что мутации в *TTN* могут являться значимой причиной развития ГКМП, что полностью подтверждается и проведенным нами анализом [23, 116, 166]. Так, в исследовании 2012 года частота *TTNtv* в группе

пациентов с ГКМП была даже ниже чем в популяции (1% и 3% соответственно) [80]. В большинстве описанных случаев ГКМП, ассоциированных с вариантами в *TTN*, прослеживается смешанный фенотип с тенденцией к развитию дилатации камер сердца и снижению сократимости миокарда. Так, описанный нами случай ГКМП с дебютом в детском возрасте, обусловленный *TTNtv*-мутацией, характеризовался быстрым развитием дилатационного ремоделирования в ответ на токсическое воздействие и снижение сократимости. Еще один описанный нами случай ГКМП, развившейся на фоне мутации в *MYH7* и *TTNtv* варианта также характеризовался снижением сократимости и развитием ХСН с умеренно низкой ФВ. Важно отметить, что сам по себе гипертрофический фенотип (ГКМП) на фоне *TTNtv*, который наблюдался в дебюте заболевания у пациента в третьем клиническом случае, является редкостью. Однако, его быстрое прогрессирование с исходом в дилатацию камер сердца с последующей трансплантацией сердца может быть обусловлено именно нарушением механоадаптивных свойств миокарда вследствие укорачивающих форм тайтина. Полученные нами данные полностью согласуются с исследованием Zhang и соавторов, в котором у пациентов с ГКМП вне зависимости от генетической природы причинной мутации наличие *TTNtv* более чем в 4 раза увеличивает риск развития СН [200].

В отличие от группы пациентов с дебютом ГКМП во взрослом возрасте, среди пациентов детского возраста нами значительно чаще выявлялись КМП, обусловленные вариантами в гене *RBM20*, а не *TTNtv*. Это полностью согласуется с литературными данными, в которых частота встречаемости вариантов в данном гене значительно выше у детей, чем в группе взрослых пациентов (6,5% и 2,5% соответственно) [155]. Показано, что КМП, обусловленные вариантами в гене *RBM20*, имеют более неблагоприятный прогноз и в большей степени ассоциированы с желудочковыми нарушениями ритма, особенно с группе пациентов мужского пола [81], являются более тяжелыми и имеют худший прогноз согласно опубликованным клиническим данным [155]. Это может быть частично обусловлено тем, что помимо

тайтина, *RBM20* также является фактором сплайсинга и для других генов саркомера и ионных каналов, таких как например Ca^{2+} /кальмодулин-зависимая киназа IIδ или альфа 1C субъединица кальциевого канала L-типа [111]. Нарушение функционирования молекулы *RBM20* приводит к увеличению размера молекулы тайтина за счет сдвига соотношения изоформ в сторону менее жесткой N2BA, что приводит к растяжению саркомера и дилатации миокарда [133]. Кроме того, *RBM20* влияет на уровень чувствительности к ионам Ca^{2+} и работу ферментов фосфорилирования, и его снижение приводит к формированию «порочного круга» снижающего пассивную жесткость саркомера [156]. На мышечных моделях также было показано увеличение содержания коллагена в миокарде в качестве компенсаторного эффекта в ответ на снижение жесткости тайтина [132]. Все эти изменения в работе миокарда обеспечивают высокую пенетрантность вариантов в гене *RBM20*. Так, например, при *RBM20* ассоциированных КМП чаще встречаются различные нарушения ритма, в особенности устойчивая желудочковая тахикардия, ФП и внезапная смерть, что контрастирует с тайтин-ассоциированными КМП [80, 84, 145]. Это в свою очередь приводит к тому, что пациенты с *RBM20*-ассоциированной КМП значительно чаще нуждаются в установке имплантируемого кардиовертер-дефибриллятора (более 60%) по сравнению с общей популяцией пациентов с ДКМП (около 27%) и пациентами с тайтин-ассоциированными КМП (менее 10%), а также в трансплантации сердца, причем в более раннем возрасте (в среднем 28 с половиной лет) [84, 93]. Данные наблюдения также подтвердились в нашем исследовании. Более того, с учетом развития методов секвенирования превалирование вариантов в гене *RBM20* в структуре детской заболеваемости ДКМП еще более велико по сравнению с данными приведенного выше исследования 2014 года. При этом для КМП, обусловленных вариантами в данном гене характерно более раннее начало и более тяжелое течения для пациентов мужского пола [81]. С учетом полученных нами и ранее опубликованных данных, а также стремительного развития и удешевления методов секвенирования нового поколения представляется

целесообразным обязательно включать ген *RBM20* в целевую панель при диагностике большинства случаев ДКМП, в особенности, в группе детей детского возраста.

В той же самой группе пациентов с КМП была произведена оценка частоты и спектра сопутствующих вариантов в генах *TTN* и *RBM20*. В качестве «сопутствующих» вариантов нами рассматривались варианты с частотой менее 0,1% для однонуклеотидных вариантов и менее 5% для укорачивающих вариантов, вариантов в сайтах сплайсинга и NF ins/del на предмет их возможной ассоциации с фенотипическим проявлением и клиническим течением заболевания (см. раздел 3.3). У всех пациентов данной группы в качестве основной причины заболевания были идентифицированы другие патогенные или вероятно патогенные варианты в генах, ассоциированных с развитием КМП. В результате проведения высокопроцессивного секвенирования у пациентов данной группы было найдено 404 варианта в гене *TTN*, в том числе 31 *TTNtv*.

По всей вероятности, совокупность единичных нуклеотидных замен в сочетании с *TTNtv* может делать миокард пациентов более уязвимым для фенотипической реализации патогенного генотипа. Так, по данным UK Biobank только около 30% носителей патогенных вариантов, ассоциированных с КМП имеют клинические проявления заболевания [175]. Возможно, именно комбинация вариантов в *TTN* и их количество могут являться одним из факторов, определяющих пенетрантность причинных патогенных мутаций. Косвенным подтверждением этому могут служить данные о локусе в гене *TTN*, ассоциированном с развитием ДКМП и ХСН [199]. В сходном исследовании также была показана значимая роль вариантов в генах цитоскелетных белков помимо *TTN* для неблагоприятного дилатационного ремоделирования при КМП [93]. По мере накопления большего количества данных секвенирования в различных группах пациентов с КМП будет уточняться вклад «сопутствующих» генетических вариантов в генах цитоскелетных белков и *TTN*. Возможно, со временем целесообразным будет включение некоторых вариантов в

данных генах в системы расчета оценки полигенного риска для персонифицированного определения прогноза у пациентов с различными вариантами КМП.

В исследованной нами группе обращает внимание относительно высокая доля вариантов неопределенной значимости у пациентов с ДКМП и НМ (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, больший 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 НМ 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 НМ (54,07%), ДКМП (58,33%) и АКМП (62,13%) в сравнении с ГКМП и РКМП.

В отличие от множества опубликованных работ, посвященных исследованию роли тайтина в развитии неишемических вариантов КМП, работы, изучающие ассоциацию вариантов в *TTN* с течением постинфарктного ремоделирования у пациентов с ИБС в доступной на сегодняшний момент научной литературе, отсутствуют. Несмотря на ожидаемый вклад укорачивающих и, возможно, однонуклеотидных вариантов *TTN* в физиологию миокарда на фоне ишемического острого и хронического стресса, работ со сходным с нашим дизайном эксперимента в современной научной литературе не встречается. Возможно, это может быть обусловлено как сложностью анализа гена тайтина в широких выборках, так и отсутствием до недавнего времени широкого распространения технологии высокопроцессивного секвенирования. Для большинства работ о клинко-генетических корреляциях у пациентов с различными видами кардиомиопатий

использовались данные, полученные в результате генетического тестирования с целью выявления причинных вариантов развития наследственной и генетически-обусловленной патологии. В то же время исследование роли вариантов в *TTN* при ишемическом поражении миокарда требует организации отдельного научного исследования и включение не рутинной диагностической и научной процедуры (секвенирование гена *TTN*) в алгоритм обследования пациента с ИБС и перенесенным ИМ. Исследование роли тайтина в ишемическом ремоделировании миокарда ранее изучалось в основном в эксперименте и было посвящено преимущественно различным вариантам фосфорилирования тайтина на фоне острого и хронического ишемического воздействия [98]. В связи с этим, а также с учётом доказанной роли *TTNtv* в течение неишемических КМП, изучение потенциальной взаимосвязи вариантов в гене тайтина со структурными изменениями в миокарде в постинфарктном периоде является крайне актуальным для научно-клинического сообщества.

В нашей работе мы показали, что среди пациентов с ХСН (n=494) частота встречаемости однонуклеотидных вариантов примерно в 4 раза выше аналогичного показателя контрольной группы (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. Вероятнее всего, единичного однонуклеотидного варианта может быть недостаточно для развития дилатационного фенотипа, однако их общая совокупность может приводить к изменению механики саркомера и общей физиологии миокарда [86]. Как и в случае с неишемическими формами ДКМП нами было показано, что укорачивающие варианты в *TTN* преимущественно локализируются в области А-зоны. Ранее другими авторами сообщалось о том, что локализация

TTNtv (зона I, A и M линия) не имеет прогностического значения в отношении течения ХСН при неишемической КМП и не определяет предиктивный ответ в отношении риска развития ХСН [10, 15, 129]. Однако, с учетом последних данных о доминантно-негативном механизме действия большинства укорачивающих форм тайтина, совпадение выявленной нами наиболее частой локализации *TTNtv* в области А-зоны при ишемическом и не ишемическом генезе дилатации представляется нам крайне важным. Ранее было показано, что *TTNtv* так же не приводят к изменению профиля экспрессии в миокарде, либо меняют его лишь в незначительной степени [86, [130]. В то же время многими исследователями неоднократно показана ассоциация *TTNtv* с развитием ранней фибрилляции предсердий и повышенным риском развития неишемических форм ДКМП [169, 174, 190]. 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, СД 2 типа, ожирение) в исследуемой группе пациентов могли оказывать значительно большее влияние на развитие наджелудочковых нарушений ритма, нежели собственно формы *TTN*, в отличие от ранее описанных другими авторами групп с ДКМП неишемического генеза с более молодым возрастом дебюта ХСН [9, 169]. Стоит отметить, что в нашей работе мы ограничивались коротким периодом наблюдения, не превышающим 24 мес после перенесенного острого инфаркта миокарда. Для более точной оценки вклада *TTNtv* в развитие наджелудочковых нарушений ритма при ХСН постинфарктного генеза, вероятно, необходимо увеличение размера исследуемой выборки для возможности более точного внесения статистической поправки на возраст, пол и наличие

сопутствующих коморбидных факторов, равно как и более длительный проспективный срок наблюдения.

Молекулярный патогенез оказываемого неблагоприятного эффекта *TTNtv* остается не до конца расшифрованным. В ряде недавних работ убедительно продемонстрировано, что укорачивающие формы тайтина экспрессируются в миокарде и оказывают неблагоприятное воздействие по доминантно-генативному механизму наряду со снижением общего содержания полноразмерных молекул тайтина [45, 86]. Предполагается, что одним из важных аспектов молекулярного патогенеза тайтинопатий является нарушение протеосомной функции и системы деградации белка вследствие формирования нерастворимых белковых тайтиновых агрегатов [45, 201]. В контексте нашего исследования хочется отметить, что нарушение работы протеосомных систем неоднократно было показано в качестве значимого фактора прогрессирования ишемического поражения миокарда и ХСН [85, 128, 194]. Таким образом раннее выявление пациентов группы риска с повышенной вероятностью развития ХСН со сниженной фракцией выброса обозначает потенциальные возможности раннего начала терапии, направленной на профилактику ХСН, в частности, с помощью новых антидиабетических препаратов, важным механизмом действия которых является стимулирование процесса аутофагии и белковой деградации [85]. Сходным образом ранее в эксперименте был продемонстрирован эффект активаторов сократительной способности миокарда (мевакаптив) в отношении изменения функции кардиомиоцитов на фоне *TTNtv*. Выявленные в исследуемой нами группе пациентов с постинфарктной ХСН укорачивающие формы тайтина потенциально могут являться субстратом для назначения персонифицированных вариантов терапии в данной группе пациентов для профилактики изменений метаболического и экспрессионного профиля кардиомиоцитов и восстановления сократительной функции миокарда.

Таким образом, в разделе работы, посвященном изучению роли вариантов в гене *TTNtv* в развитии постинфарктной ХСН 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). При этом в отдельных группах пациентов наблюдалась достоверная разница в частоте встречаемости минорных аллелей данных вариантов в зависимости от наличия ФП, что наводит на мысль о необходимости увеличения исследуемой группы и проспективного наблюдения для получения статистически достоверного результата. 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. 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 высокопроцессивное 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 СОКРАЩЕНИЙ

- АКМП – аритмогенная кардиомиопатия
АлкКМП – алкогольная кардиомиопатия
ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия
ДИ – доверительный интервал
ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
ДМЖП – дефект межжелудочковой перегородки
ДМПП – дефект межпредсердной перегородки
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
КДР – конечный диастолический размер
КМП – кардиомиопатия
ЛЖ – левый желудочек
ЛОТС - лист ожидания трансплантации сердца
ЛП – левое предсердие
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
МРТ – магнитно-резонансная томография
НМ – некомпактный миокард
НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка
ОР – отношение рисков
ПБЛНПП – полная блокада левой ножки пучка Гиса
ПКМП – перипартальная кардиомиопатия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РКМП – рестриктивная кардиомиопатия
РНК – рибонуклеиновая кислота
СД – сахарный диабет

СМЭКГ – суточное мониторирование электрокардиограммы

СН – сердечная недостаточность

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ФВ – фракция выброса

ФИЗК – фосфатидилинозитол-3-киназа

ФК – функциональный класс

ФП – фибрилляция предсердий

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

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭКГ - электрокардиография

ЭхоКГ – эхокардиография

ACMG – Американский колледж медицинской генетики и геномики

CADD – инструмент для вычисления патогенности удаления единичного нуклеотида из структуры гена

GATK – биоинформатическая программа для анализа результатов секвенирования

GWAS – полногеномный поиск ассоциаций

MAF – частота встречаемости минорного аллеля

NF ins/del – инсерции и делеции без сдвига рамки считывания

NT-proBNP – N-терминальный фрагмент мозгового натрийуретического пептида

PSI – процент сплайсинга

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

TTNtv – укорачивающие варианты в гене *TTN*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев Ф. Т. Больные с хронической сердечной недостаточностью в российской амбулаторной практике: особенности контингента, диагностики и лечения (по материалам исследования ЭПОХА-О-ХСН) / Ф. Т. Агеев, М. О. Даниелян, В. Ю. Мареев // Журнал Сердечная Недостаточность. – 2008. – № 5. – С. 4.
2. 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. – 2023. – Vol. 9. – № 6. – С. 26-35.
3. Бойцов С. А. Исследование ЭССЕ-РФ (Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний и их факторов риска в регионах Российской Федерации). Десять лет спустя / С. А. Бойцов, О. М. Драпкина, Е. В. Шляхто [et al.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – Vol. 20. – № 5. – С. 3007.
4. Вайханская Т.Г. Смена концепции аритмогенной кардиомиопатии: расширение клиничко-генетического спектра, новые критерии диагностики левожелудочковых фенотипов / Вайханская Т.Г., Л. Н. Сивицкая, Т. В. Курушко [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Vol. 25. – № 10. – С. 3863.
5. Вахрушев Ю. А. Спектр непатогенных вариантов в гене тайтина и генах внутри- и внесаркомерного цитоскелета (*TTN*, *MYBPC3*, *FLNC*, *RBM20*) у пациентов с различными вариантами кардиомиопатий / Ю. А. Вахрушев, А. S. Muravyov, А. А. Kozyreva [et al.] // Трансляционная медицина. – 2022. – Vol. 9. – № 2. – С. 37-49.
6. Габрусенко С. А. Гипертрофическая кардиомиопатия. Клинические рекомендации 2020 / С. А. Габрусенко, А. Я. Гудкова, Н. А. Козиолова [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2021. – Vol. 26. – № 5. – С. 4541.
7. Лясникова Е. А. Генетические детерминанты, ассоциированные с развитием и прогнозом постинфарктного ремоделирования и хронической сердечной недостаточности / Е. А. Лясникова, А. М. Улитин, В. М. Тишкова [et al.] // Трансляционная медицина. – 2018. – Vol. 5. – № 1. – С. 15-24.

8. Мареев В. Ю. Клинические рекомендации ОССН - РКО - РНМОТ. Сердечная недостаточность: хроническая (ХСН) и острая декомпенсированная (ОДСН). Диагностика, профилактика и лечение / В. Ю. Мареев, О. В. Фомин, Ф. Т. Агеев [et al.] // Кардиология. – 2018. – Vol. 58. – № 6S. – С. 8-158.
9. Рыжкова О. П. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) / О. П. Рыжкова, О. Л. Кардымон, Е. Б. Прохорчук [et al.] // Медицинская генетика. – 2019. – Vol. 18. – № 2. – С. 3-23.
10. Терещенко С. Н. Хроническая сердечная недостаточность. Клинические рекомендации 2020 / С. Н. Терещенко, А. С. Галявич, Т. М. Ускач [et al.] // Российский кардиологический журнал. – 2020. – Vol. 25. – № 11. – С. 311-374.
11. Фомин И. В. Распространенность хронической сердечной недостаточности в европейской части российской федерации - данные ЭПОХА-ХСН / И. В. Фомин, Ю. Н. Беленков, В. Ю. Мареев // Журнал Сердечная Недостаточность. – 2003. – Vol. 7. – № 3. – С. 112.
12. Ahlberg G. Rare truncating variants in the sarcomeric protein titin associate with familial and early-onset atrial fibrillation / G. Ahlberg, L. Refsgaard, P. R. Lundegaard [et al.] // Nature communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1.
13. Akhtar M. M. Clinical phenotypes and prognosis of dilated cardiomyopathy caused by truncating variants in the TTN gene / M. M. Akhtar, M. Lorenzini, M. Cicerchia [et al.] // Circulation. Heart failure. – 2020. – Vol. 13. – № 10. – P. E006832.
14. Akinrinade O. Relevance of truncating titin mutations in dilated cardiomyopathy / O. Akinrinade, T. P. Alastalo, J. W. Koskenvuo // Clinical Genetics. – 2016. – Vol. 90. – № 1. – P. 49-54.
15. Akinrinade O. Relevance of titin missense and non-frameshifting insertions/deletions variants in dilated cardiomyopathy / O. Akinrinade, T. Heliö, R. H. Lekanne Deprez [et al.] // Scientific reports. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 4093.
16. Akinrinade O. Prevalence of titin truncating variants in general population / O.

Akinrinade, J. W. Koskenvuo, T. P. Alastalo // *PloS one.* – 2015. – Vol. 10. – № 12. P. e0145284.

17. Alegre-Cebollada J. S-glutathionylation of cryptic cysteines enhances titin elasticity by blocking protein folding / J. Alegre-Cebollada, P. Kosuri, D. Giganti [et al.] // *Cell.* – 2014. – Vol. 156. – № 6. – P. 1235-1246.

18. Anderson J. L. Discovery of titin gene truncating variant mutations and 5-Year outcomes in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy / J. L. Anderson, G. B. Christensen, H. Escobar [et al.] // *The American journal of cardiology.* – 2020. – Vol. 137. – P. 97-102.

19. Bai Y. Association of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism with heart failure: a meta-analysis / Y. Bai, L. Wang, S. Hu [et al.] // *Molecular and cellular biochemistry.* – 2012. – Vol. 361. – № 1-2. – P. 297-304.

20. Bang M. L. The complete gene sequence of titin, expression of an unusual ≈ 700 -kDa titin isoform, and its interaction with obscurin identify a novel Z-line to I-band linking system / M. L. Bang, T. Centner, F. Fornoff [et al.] // *Circulation Research.* – 2001. – Vol. 89. – № 11. – P. 1065-1072.

21. Bauersachs J. Guidelines of the ESC 2021 on heart failure / J. Bauersachs, S. Soltani // *Herz.* – 2022. – Vol. 47. – № 1. – P. 12-18.

22. Beqqali A. A mutation in the glutamate-rich region of RNA-binding motif protein 20 causes dilated cardiomyopathy through missplicing of titin and impaired Frank-Starling mechanism / A. Beqqali, I. A. E. Bollen, T. B. Rasmussen [et al.] // *Cardiovascular Research.* – 2016. – Vol. 112. – № 1. – P. 452-463.

23. Bleumink G. S. Genetic polymorphisms and heart failure / G. S. Bleumink, A. F. C. Schut, M. C. J. M. Sturkenboom [et al.] // *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics.* – 2004. – Vol. 6. – № 6. – P. 465-474.

24. Boerrigter G. Targeting heme-oxidized soluble guanylate cyclase in experimental heart failure / G. Boerrigter, L. C. Costello-Boerrigter, A. Cataliotti [et al.] // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 49. – № 5. – P. 1128-1133.

25. Borbély A. Hypophosphorylation of the Stiff N2B titin isoform raises cardiomyocyte resting tension in failing human myocardium / A. Borbély, I. Falcao-Pires, L. Van Heerebeek [et al.] // *Circulation research*. – 2009. – Vol. 104. – № 6. – P. 780-786.
26. Bos J. M. Genotype-phenotype relationships involving hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations in titin, muscle LIM protein, and telethonin / J. M. Bos, R. N. Poley, M. Ny [et al.] // *Molecular genetics and metabolism*. – 2006. – Vol. 88. – № 1. – P. 78-85.
27. Brauch K. M. Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy / K. M. Brauch, M. L. Karst, K. J. Herron [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2009. – Vol. 54. – № 10. – P. 930-941.
28. Brocchieri L. Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes / L. Brocchieri, S. Karlin // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – № 10. – P. 3390-3400.
29. Buck D. Removal of immunoglobulin-like domains from titin's spring segment alters titin splicing in mouse skeletal muscle and causes myopathy / D. Buck, J. E. Smith, C. S. Chung [et al.] // *Journal of General Physiology*. – 2014. – Vol. 143. – № 2. – P. 215-230.
30. Buckley B. J. R. Atrial fibrillation in patients with cardiomyopathy: Prevalence and clinical outcomes from real-world data / B. J. R. Buckley, S. L. Harrison, D. Gupta [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – Vol. 10. – № 23. – P. 21970.
31. Bull M. Alternative splicing of titin restores diastolic function in an HFpEF-like genetic murine model (Ttn Δ IAjxn) / M. Bull, M. Methawasin, J. Strom [et al.] // *Circulation Research*. – 2016. – Vol. 119. – № 6. – P. 764-772.
32. Cappola T. P. Common variants in HSPB7 and FRMD4B associated with advanced heart failure / T. P. Cappola, M. Li, J. He [et al.] // *Circulation. Cardiovascular genetics*. – 2010. – Vol. 3. – № 2. – P. 147-154.
33. Cardinale D. Anthracycline-induced cardiomyopathy. clinical relevance and response to pharmacologic therapy / D. Cardinale, A. Colombo, G. Lamantia [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – Vol. 55. – № 3. – P. 213-220.

34. Carmignac V. C-terminal titin deletions cause a novel early-onset myopathy with fatal cardiomyopathy / V. Carmignac, M. A. M. Salih, S. Quijano-Roy [et al.] // *Annals of Neurology*. – 2007. – Vol. 61. – № 4. – P. 340-351.
35. Cazorla O. Titin-based modulation of calcium sensitivity of active tension in mouse skinned cardiac myocytes / O. Cazorla, Y. Wu, T. C. Irving [et al.] // *Circulation Research*. – 2001. – Vol. 88. – № 10. – P. 1028-1035.
36. Ceyhan-Birsoy O. Recessive truncating titin gene, TTN, mutations presenting as centronuclear myopathy / O. Ceyhan-Birsoy, P. B. Agrawal, C. Hidalgo [et al.] // *Neurology*. – 2013. – Vol. 81. – № 14. – P. 1205-1214.
37. Chan M. Y. Prioritizing candidates of post-myocardial infarction heart failure using plasma proteomics and single-cell transcriptomics / M. Y. Chan, M. Efthymios, S. H. Tan [et al.] // *Circulation*. – 2020. – Vol. 142. – № 15. – P. 1408-1421.
38. Chauveau C. A rising titan: TTN review and mutation update / C. Chauveau, J. Rowell, A. Ferreira // *Human Mutation*. – 2014. – Vol. 35. – № 9. – P. 1046-1059.
39. Chen K. Absence of a primary role for TTN missense variants in arrhythmogenic cardiomyopathy: From a clinical and pathological perspective / K. Chen, J. Song, Z. Wang [et al.] // *Clinical cardiology*. – 2018. – Vol. 41. – № 5. – P. 615-622.
40. Christophersen I.E. Erratum: Large-scale analyses of common and rare variants identify 12 new loci associated with atrial fibrillation / Christophersen I.E., Rienstra M., Roselli C.X [et al.] // *Nature genetics*. – 2017. – Vol. 49. – № 8. – P. 1286.
41. Dai J. RBM20 is a candidate gene for hypertrophic cardiomyopathy / J. Dai, Z. Li, W. Huang [et al.] // *Canadian Journal of Cardiology*. – 2021. – Vol. 37. – № 11. – P. 1751-1759.
42. Deo R. C. Alternative splicing, internal promoter, nonsense-mediated decay, or all three: explaining the distribution of truncation variants in titin / R. C. Deo // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 419-425.
43. Dijk S. J. Van. Contractile dysfunction irrespective of the mutant protein in human hypertrophic cardiomyopathy with normal systolic function / S. J. Van Dijk, E. R.

Paalberends, A. Najafi [et al.] // *Circulation: Heart Failure*. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 36-46.

44. Doenst T. Cardiac metabolism in heart failure: Implications beyond atp production / T. Doenst, T. D. Nguyen, E. D. Abel // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 113. – № 6. – P. 709-724.

45. Duzkale H. A systematic approach to assessing the clinical significance of genetic variants / H. Duzkale, J. Shen, H. Mclaughlin [et al.] // *Clinical genetics*. – 2013. – Vol. 84. – № 5. – P. 453-463.

46. Elliott P. Classification of the cardiomyopathies: A position statement from the european society of cardiology working group on myocardial and pericardial diseases / P. Elliott, B. Andersson, E. Arbustini [et al.] // *European Heart Journal*. – 2008. – Vol. 29. – № 2. – P. 270-276.

47. Felker G. M. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy / G. M. Felker, R. E. Thompson, J. M. Hare [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2000. – Vol. 342. – № 15. – P. 1077-1084.

48. Fernández-Solà J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption / J. Fernández-Solà // *Nature Reviews Cardiology*. – 2015. – Vol. 12. – № 10. – P. 576-587.

49. Fomin A. Truncated titin proteins and titin haploinsufficiency are targets for functional recovery in human cardiomyopathy due to TTN mutations / A. Fomin, A. Gärtner, L. Cyganek [et al.] // *Science translational medicine*. – 2021. – Vol. 13. – № 618.

50. Freiburg A. Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the structural basis for myofibrillar elastic diversity / A. Freiburg, K. Trombitas, W. Hell [et al.] // *Circulation Research*. – 2000. – Vol. 86. – № 11. – P. 1114-1121.

51. Frutos F. de. Natural history of MYH7-related dilated cardiomyopathy / F. de Frutos, J. P. Ochoa, M. Navarro-Peñalver [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2022. – Vol. 80. – № 15. – P. 1447-1461.

52. Fukuda N. Titin/connectin-based modulation of the Frank-Starling mechanism of the

- heart / N. Fukuda, H. L. Granzier // *Journal of muscle research and cell motility*. – 2005. – Vol. 26. – № 6-8. – P. 319-323.
53. Fukuda N. Titin isoform variance and length dependence of activation in skinned bovine cardiac muscle / N. Fukuda, Y. Wu, G. Farman [et al.] // *Journal of Physiology*. – 2003. – Vol. 553. – № 1. – P. 147-154.
54. Fung K. Genome-wide association study identifies loci for arterial stiffness index in 127,121 UK Biobank participants / K. Fung, J. Ramírez, H. R. Warren [et al.] // *Scientific reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 9143.
55. Furst D. O. The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: A map of ten nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line / D. O. Furst, M. Osborn, R. Nave [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 1988. – Vol. 106. – № 5. – P. 1563-1572.
56. Garcia-Pavia P. Genetic variants associated with cancer therapy-induced cardiomyopathy / P. Garcia-Pavia, Y. Kim, M. A. Restrepo-Cordoba [et al.] // *Circulation*. – 2019. – Vol. 140. – № 1. – P. 31-41.
57. Garnier S. Genome-wide association analysis in dilated cardiomyopathy reveals two new players in systolic heart failure on chromosomes 3p25.1 and 22q11.23 / S. Garnier, M. Harakalova, S. Weiss [et al.] // *European heart journal*. – 2021. – Vol. 42. – № 20. – P. 2000-2011.
58. Gautel M. Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing / M. Gautel // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 39-46.
59. Gautel M. The sarcomeric cytoskeleton: Who picks up the strain? / M. Gautel // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2011. – Vol. 23. – № 1. – P. 39-46.
60. George A. Alcoholic cardiomyopathy: A review / A. George, V. M. Figueredo // *Journal of Cardiac Failure*. – 2011. – Vol. 17. – № 10. – P. 844-849.
61. Gerull B. Between disease-causing and an innocent bystander: the role of titin as a modifier in hypertrophic cardiomyopathy / B. Gerull // *The Canadian journal of cardiology*. – 2017. – Vol. 33. – № 10. – P. 1217-1220.

62. Gerull B. The rapidly evolving role of titin in cardiac physiology and cardiomyopathy / B. Gerull // *Canadian Journal of Cardiology*. – 2015. – Vol. 31. – № 11. – P. 1351-1359.
63. Gerull B. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy / B. Gerull, M. Gramlich, J. Atherton [et al.] // *Nature Genetics*. – 2002. – Vol. 30. – № 2. – P. 201-204.
64. Golbus J. R. Population-Based Variation in Cardiomyopathy / J. R. Golbus, M. J. Puckelwartz, J. P. Fahrenbach [et al.] // *Genes*. – 2012. – Vol. 5. – № 4. – P. 391-399.
65. Gramlich M. Stress-induced dilated cardiomyopathy in a knock-in mouse model mimicking human titin-based disease / M. Gramlich, B. Michely, C. Krohne [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2009. – Vol. 47. – № 3. – P. 352-358.
66. Granzier H. L. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease / H. L. Granzier, S. Labeit // *Circulation Research*. – 2004. – Vol. 94. – № 3. – P. 284-295.
67. Grützner A. Modulation of titin-based stiffness by disulfide bonding in the cardiac titin N2-B unique sequence / A. Grützner, S. Garcia-Manyes, S. Kötter [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2009. – Vol. 97. – № 3. – P. 825-834.
68. Guo W. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing / W. Guo, S. Schafer, M. L. Greaser [et al.] // *Nature Medicine*. – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 766-773.
69. Guo W. Splicing factor RBM20 regulates transcriptional network of titin associated and calcium handling genes in the heart / W. Guo, C. Zhu, Z. Yin [et al.] // *International Journal of Biological Sciences*. – 2018. – Vol. 14. – № 4. – P. 369.
70. Guzzo-Merello G. Alcoholic cardiomyopathy / G. Guzzo-Merello // *World Journal of Cardiology*. – 2014. – Vol. 6. – № 8. – P. 771.
71. Haas J. Targeted next-generation sequencing: The clinician's stethoscope for genetic disorders / J. Haas, I. Barb, H. A. Katus [et al.] // *Personalized Medicine*. – 2014. – Vol. 11. – № 6. – P. 581-592.

72. Haas J. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy / J. Haas, K. S. Frese, B. Peil [et al.] // *European Heart Journal*. – 2015. – Vol. 36. – № 18. – P. 1123-1135.
73. Haggerty C. M. Genomics-first evaluation of heart disease associated with titin-truncating variants / C. M. Haggerty, S. M. Damrauer, M. G. Levin [et al.] // *Circulation*. – 2019. – Vol. 140. – № 1. – P. 42-54.
74. Hamdani N. Deranged myofilament phosphorylation and function in experimental heart failure with preserved ejection fraction / N. Hamdani, K. G. Bishu, M. Von Frieling-Salewsky [et al.] // *Cardiovasc Res*. – 2013. – Vol. 97. – № 3. – P. 464-471.
75. Hamdani N. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model / N. Hamdani, C. Franssen, A. Lourenço [et al.] // *Circulation: Heart Failure*. – 2013. – Vol. 6. – № 6. – P. 1239-1249.
76. Hamdani N. Crucial role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-II in regulating diastolic stress of normal and failing hearts via titin phosphorylation / N. Hamdani, J. Krysiak, M. M. Kreusser [et al.] // *Circulation Research*. – 2013. – Vol. 112. – № 4. – P. 664-674.
77. Haravuori H. Assignment of the tibial muscular dystrophy locus to chromosome 2q31 / H. Haravuori, P. Mäkelä-Bengs, B. Udd [et al.] // *American Journal of Human Genetics*. – 1998. – Vol. 62. – № 3. – P. 620-626.
78. Hastings R. Combination of whole genome sequencing, linkage, and functional studies implicates a missense mutation in titin as a cause of autosomal dominant cardiomyopathy with features of left ventricular noncompaction / R. Hastings, C. P. De Villiers, C. Hooper [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 426-435.
79. Heerebeek L. Van. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction / L. Van Heerebeek, N. Hamdani, I. Falcão-Pires [et al.] // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126. – № 7. – P. 830-839.

80. Herman D. S. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy / D. S. Herman, L. Lam, M. R. G. Taylor [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2012. – Vol. 366. – № 7. – P. 619-628.
81. Hey T. M. Pathogenic RBM20-variants are associated with a severe disease expression in male patients with dilated cardiomyopathy / T. M. Hey, T. B. Rasmussen, T. Madsen [et al.] // *Circulation. Heart failure*. – 2019. – Vol. 12. – № 3.
82. Hidalgo C. G. The multifunctional Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II delta (CaMKII δ) phosphorylates cardiac titin's spring elements / C. G. Hidalgo, C. S. Chung, C. Saripalli [et al.] // *Journal of molecular and cellular cardiology*. – 2013. – Vol. 54. – № 1. – P. 90-97.
83. Hinson J. T. Titin mutations in iPS cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy / J. T. Hinson, A. Chopra, N. Nafissi [et al.] // *Science*. – 2015. – Vol. 349. – № 6251. – P. 982-986.
84. Hoogenhof M. M. G. Van Den. RBM20 mutations induce an arrhythmogenic dilated cardiomyopathy related to disturbed calcium handling / M. M. G. Van Den Hoogenhof, A. Beqqali, A. S. Amin [et al.] // *Circulation*. – 2018. – Vol. 138. – № 13. – P. 1330-1342.
85. Hsu C. N. Anti-diabetic therapy and heart failure: recent advances in clinical evidence and molecular mechanism / C. N. Hsu, C. F. Hsuan, D. Liao [et al.] // *Life (Basel, Switzerland)*. – 2023. – Vol. 13. – № 4. – P. 1024.
86. Huang G. Titin-truncating variants in hiPSC cardiomyocytes induce pathogenic proteinopathy and sarcomere defects with preserved core contractile machinery / G. Huang, A. Bisaria, D. L. Wakefield [et al.] // *Stem cell reports*. – 2023. – Vol. 18. – № 1. – P. 220-236.
87. Huttlin E. L. A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression / E. L. Huttlin, M. P. Jedrychowski, J. E. Elias [et al.] // *Cell*. – 2010. – Vol. 143. – № 7. – P. 1174-1189.
88. James C. A. The role of genetics in cardiovascular disease: arrhythmogenic cardiomyopathy / C. A. James, P. Syrris, J. P. Van Tintelen [et al.] // *European heart*

journal. – 2020. – Vol. 41. – № 14. – P. 1393-1400.

89. Kapplinger J. D. Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise / J. D. Kapplinger, A. P. Landstrom, B. A. Salisbury [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2011. – Vol. 57. – № 23. – P. 2317-2327.

90. Katz A. M. Ernest Henry Starling, his predecessors, and the “Law of the Heart”. / A. M. Katz // *Circulation*. – 2002. – Vol. 106. – № 23. – P. 2986-2992.

91. Kayvanpour E. Genotype-phenotype associations in dilated cardiomyopathy: meta-analysis on more than 8000 individuals / E. Kayvanpour, F. Sedaghat-Hamedani, A. Amr [et al.] // *Clinical Research in Cardiology*. – 2017. – Vol. 106. – № 2. – P. 127-139.

92. Kellermayer D. Increased expression of N2BA titin corresponds to more compliant myofibrils in athlete’s heart / D. Kellermayer, B. Kiss, H. Tordai [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22. – № 20. – P. 11110.

93. Kervella M. Genome organization in cardiomyocytes expressing mutated A-type lamins / M. Kervella, M. Jahier, A. C. Meli [et al.] // *Frontiers in cell and developmental biology*. – 2022. – Vol. 10. – P. 1030950.

94. Keurs H. E. D. J. Ter. Heart failure and Starling’s Law of the heart / H. E. D. J. Ter Keurs // *Canadian Journal of Cardiology*. – 1996. – Vol. 12. – № 10. – P. 1047-1057.

95. Koser F. Posttranslational modifications of titin from cardiac muscle: how, where, and what for? / F. Koser, C. Loescher, W. A. Linke // *FEBS Journal*. – 2019. – Vol. 286. – № 12. – P. 2240-2260.

96. Kötter S. Titin: Central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control / S. Kötter, C. Andresen, M. Krüger // *Biological Chemistry*. – 2014. – Vol. 395. – № 11. – P. 1341-1352.

97. Kötter S. Differential changes in titin domain phosphorylation increase myofilament stiffness in failing human hearts / S. Kötter, L. Gout, M. Von Frieling-Salewsky [et al.] // *Cardiovascular Research*. – 2013. – Vol. 99. – № 4. – P. 648-656.

98. Kovács Á. Interventricular differences of signaling pathways-mediated regulation of

cardiomyocyte function in response to high oxidative stress in the post-ischemic failing rat heart / Á. Kovács, M. Herwig, H. Budde [et al.] // *Antioxidants* (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 10. – № 6. – P. 964.

99. Krüger M. Insulin signaling regulates cardiac titin properties in heart development and diabetic cardiomyopathy / M. Krüger, K. Babicz, M. von Frieling-Salewsky [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2010. – Vol. 48. – № 5. – P. 910-916.

100. Krüger M. Developmental changes in passive stiffness and myofilament Ca²⁺ sensitivity due to titin and troponin-I isoform switching are not critically triggered by birth / M. Krüger, T. Kohl, W. A. Linke // *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. – 2006. – Vol. 291. – № 2. – P. 496-506.

101. Krüger M. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs / M. Krüger, S. Kötter, A. Grützner [et al.] // *Circulation Research*. – 2009. – Vol. 104. – № 1. – P. 87-94.

102. Krüger M. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension / M. Krüger, W. A. Linke // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2006. – Vol. 27. – № 5-7. – P. 435-444.

103. Krüger M. Thyroid hormone regulates developmental titin isoform transitions via the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway / M. Krüger, C. Sachse, W. H. Zimmermann [et al.] // *Circulation Research*. – 2008. – Vol. 102. – № 4. – P. 439-447.

104. Labeit S. A regular pattern of two types of 100-residue motif in the sequence of titin / S. Labeit, D. P. Barlow, M. Gautel [et al.] // *Nature*. – 1990. – Vol. 345. – № 6272. – P. 273-276.

105. Labeit S. Titins: Giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity / S. Labeit, B. Kolmerer // *Science*. – 1995. – Vol. 270. – № 5234. – P. 293-296.

106. Labeit S. Expression of distinct classes of titin isoforms in striated and smooth muscles by alternative splicing, and their conserved interaction with filamins / S. Labeit, S. Lahmers, C. Burkart [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 362. – № 4. – P. 664-681.

107. Lai L. Energy metabolic reprogramming in the hypertrophied and early stage failing heart a multisystems approach / L. Lai, T. C. Leone, M. P. Keller [et al.] // *Circulation: Heart Failure*. – 2014. – Vol. 7. – № 6. – P. 1022-1031.
108. Lange S. From A to Z and back? Multicompartment proteins in the sarcomere / S. Lange, E. Ehler, M. Gautel // *Trends in Cell Biology*. – 2006. – Vol. 16. – № 1. – P. 11-18.
109. Lange S. The Kinase Domain of Titin Controls Muscle Gene Expression and Protein Turnover / S. Lange, F. Xiang, A. Yakovenko [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 308. – № 5728. – P. 1599-1603.
110. Lee E. J. Calcium sensitivity and the Frank-Starling mechanism of the heart are increased in titin N2B region-deficient mice / E. J. Lee, J. Peng, M. Radke [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2010. – Vol. 49. – № 3. – P. 449-458.
111. Lennermann D. New insights in RBM20 cardiomyopathy / D. Lennermann, J. Backs, M. M. G. van den Hoogenhof // *Current Heart Failure Reports*. – 2020. – Vol. 17. – № 5. – P. 234-246.
112. Lewinter M. M. Titin is a major human disease gene / M. M. Lewinter, H. L. Granzier // *Circulation*. – 2013. – Vol. 127. – № 8. – P. 938-944.
113. Li D. Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy / D. Li, A. Morales, J. Gonzalez-Quintana [et al.] // *Clinical and Translational Science*. – 2010. – Vol. 3. – № 3. – P. 90-97.
114. Li H. Reverse engineering of the giant muscle protein titin / H. Li, W. A. Linke, A. F. Oberhauser [et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 418. – № 6901. – P. 998-1002.
115. Li L. A Potential Oligogenic Etiology of Hypertrophic Cardiomyopathy: A Classic Single-Gene Disorder / L. Li, M. N. Bainbridge, Y. Tan [et al.] // *Circulation research*. – 2017. – Vol. 120. – № 7. – P. 1084-1090.
116. Li S. RBM20 regulates titin alternative splicing as a splicing repressor / S. Li, W. Guo, C. N. Dewey [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2013. – Vol. 41. – № 4. – P. 2659–2672.
117. Linke W. A. Sense and stretchability: The role of titin and titin-associated proteins

in myocardial stress-sensing and mechanical dysfunction / W. A. Linke // *Cardiovascular research*. – 2008. – Vol. 77. – №4. – P. 637–648.

118. Linke W. A. Gigantic business: Titin properties and function through thick and thin / W. A. Linke, N. Hamdani // *Circulation Research*. – 2014. – Vol. 114. – № 6. – P. 1052-1068.

119. Linke W. A. Towards a molecular understanding of the elasticity of titin / W. A. Linke, M. Ivemeyer, N. Olivieri [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 1996. – Vol. 261. – № 1. – P. 62-71.

120. Linke W. A. I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure / W. A. Linke, D. E. Rudy, T. Centner [et al.] // *Journal of Cell Biology*. – 1999. – Vol. 146. – № 3. – P. 631-644.

121. Linschoten M. Truncating Titin (TTN) Variants in Chemotherapy-Induced Cardiomyopathy / M. Linschoten, A. J. Teske, A. F. Baas [et al.] // *Journal of Cardiac Failure*. – 2017. – Vol. 23. – № 6. – P. 476-479.

122. Lopes L. R. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing / L. R. Lopes, A. Zekavati, P. Syrris [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2013. – Vol. 50. – № 4. – P. 228-239.

123. Lundby A. Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues / A. Lundby, A. Secher, K. Lage [et al.] // *Nature Communications*. – 2012. – Vol. 3. – P. 876.

124. Lunde I. G. Abstract 279: a deletion in the N2A region of titin carried by muscular dystrophy with myositis (mdm) mice severely affects skeletal muscle, but not the heart / I. G. Lunde, H. Wakimoto, M. A. Burke [et al.] // *Circulation Research*. – 2014. – Vol. 115. – P. 279.

125. Lunde I.G., H. Wakimoto M. B. Titin A-band truncation in mice causes stress-induced dilated cardiomyopathy / M. B. Lunde I.G., H. Wakimoto // *European Journal of Heart Failure*. – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 31.

126. Makarenko I. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin

- isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts / I. Makarenko, C. A. Opitz, M. C. Leake [et al.] // *Circulation Research*. – 2004. – Vol. 95. – № 7. – P. 708-716.
127. Maron B. J. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: An American heart association scientific statement from the council on clinical cardiology, heart failure and transplantation committee; quality of care and outcomes research and function / B. J. Maron, J. A. Towbin, G. Thiene [et al.] // *Circulation*. – 2006. – Vol. 113. – № 14. – P. 1807-1816.
128. Marzoug B. A. Autophagy behavior in post-myocardial infarction injury / B. A. Marzoug // *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. – 2023. – Vol. 23. – № 1. – P. 2-10.
129. Mathew T. Diagnosis and assessment of dilated cardiomyopathy: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography / T. Mathew, L. Williams, G. Navaratnam [et al.] // *Echo research and practice*. – 2017. – Vol. 4. – № 2. – P. 1-13.
130. McAfee Q. Truncated titin proteins in dilated cardiomyopathy / Q. McAfee, C. Y. Chen, Y. Yang [et al.] // *Science translational medicine*. – 2021. – Vol. 13. – № 618.
131. Merlo M. Poor prognosis of rare sarcomeric gene variants in patients with dilated cardiomyopathy / M. Merlo, G. Sinagra, E. Carniel [et al.] // *Clinical and Translational Science*. – 2013. – Vol. 6. – № 6. – P. 424-428.
132. Methawasin M. Experimentally increasing titin compliance in a novel mouse model attenuates the Frank-Starling mechanism but has a beneficial effect on diastole / M. Methawasin, K. R. Hutchinson, E. J. Lee [et al.] // *Circulation*. – 2014. – Vol. 129. – № 19. – P. 1924-1936.
133. Methawasin M. Experimentally increasing the compliance of titin through rna binding motif-20 (RBM20) inhibition improves diastolic function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction / M. Methawasin, J. G. Strom, R. E. Slater [et al.] // *Circulation*. – 2016. – Vol. 134. – № 15. – P. 1085-1099.
134. Miller E. M. Uptake of cardiac screening and genetic testing among hypertrophic and dilated cardiomyopathy families / E. M. Miller, Y. Wang, S. M. Ware // *Journal of*

Genetic Counseling. – 2013. – Vol. 22. – № 2. – P. 258-267.

135. Miller M. K. The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. / M. K. Miller, H. Granzier, E. Ehler [et al.] // Trends in cell biology. – 2004. – Vol. 14. – № 3. – P. 119-26.

136. Morales A. Rare variant mutations in pregnancy-associated or peripartum cardiomyopathy / A. Morales, T. Painter, R. Li [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 121. – № 20. – P. 2176-2182.

137. Muhle-Goll C. Structural and functional studies of titin's fn3 modules reveal conserved surface patterns and binding to myosin s1 - a possible role in the Frank-Starling mechanism of the heart / C. Muhle-Goll, M. Habeck, O. Cazorla [et al.] // Journal of Molecular Biology. – 2001. – Vol. 313. – № 2. – P. 431-447.

138. Murayama R. Phosphorylation of the RSRSP stretch is critical for splicing regulation by RNA-Binding Motif Protein 20 (RBM20) through nuclear localization / R. Murayama, M. Kimura-Asami, M. Togo-Ohno [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-14.

139. Nagueh S. F. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy / S. F. Nagueh, G. Shah, Y. Wu [et al.] // Circulation. – 2004. – Vol. 110. – № 2. – P. 155-162.

140. Neagoe C. Titin isoform switch in ischemic human heart disease / C. Neagoe, M. Kulke, F. Del Monte [et al.] // Circulation. – 2002. – Vol. 106. – № 11. – P. 1333-1341.

141. Neagoe C. Gigantic variety: Expression patterns of titin isoforms in striated muscles and consequences for myofibrillar passive stiffness / C. Neagoe, C. A. Opitz, I. Makarenko [et al.] // Journal of Muscle Research and Cell Motility. – 2003. – Vol. 24. – № 2-3. – P. 175-189.

142. Neishabouri S. H. Chronic activation of mTOR complex 1 by branched chain amino acids and organ hypertrophy / S. H. Neishabouri, S. M. Hutson, J. Davoodi // Amino Acids. – 2015. – Vol. 47. – № 6. – P. 1167-1182.

143. Norton N. Exome sequencing and genome-wide linkage analysis in 17 families

illustrate the complex contribution of TTN truncating variants to dilated cardiomyopathy / N. Norton, D. Li, E. Rampersaud [et al.] // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2013. – Vol. 6. – № 2. – P. 144-153.

144. Opitz C. A. Developmentally regulated switching of titin size alters myofibrillar stiffness in the perinatal heart / C. A. Opitz, M. C. Leake, I. Makarenko [et al.] // *Circulation Research*. – 2004. – Vol. 94. – № 7. – P. 967-975.

145. Palmio J. Hereditary myopathy with early respiratory failure: Occurrence in various populations / J. Palmio, A. Evilä, F. Chapon [et al.] // *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. – 2014. – Vol. 85. – № 3. – P. 345-353.

146. Parikh V. N. Regional variation in RBM20 causes a highly penetrant arrhythmogenic cardiomyopathy / V. N. Parikh, C. Caleshu, C. Reuter [et al.] // *Circulation: Heart Failure*. – 2019. – Vol. 12. – № 3. – P. 1-9.

147. Patel P. N. Contribution of noncanonical splice variants to ttn truncating variant cardiomyopathy / P. N. Patel, K. Ito, J. A. L. Willcox [et al.] // *Circulation. Genomic and precision medicine*. – 2021. – Vol. 14. – № 5. – P. e003389.

148. Paulus W. J. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: Comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation / W. J. Paulus, C. Tschöpe // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2013. – Vol. 62. – № 4. – P. 263-271.

149. Pearson G. D. Peripartum cardiomyopathy / G. D. Pearson, J.-C. Veille, S. Rahimtoola [et al.] // *JAMA*. – 2000. – Vol. 283. – № 9. – P. 1183.

150. Peled Y. Titin mutation in familial restrictive cardiomyopathy / Y. Peled, M. Gramlich, G. Yoskovitz [et al.] // *International Journal of Cardiology*. – 2014. – Vol. 171. – № 1. – P. 24-30.

151. Pensa A. V. Genetically based atrial fibrillation: Current considerations for diagnosis and management / A. V. Pensa, J. R. Baman, M. J. Puckelwartz [et al.] // *Journal of cardiovascular electrophysiology*. – 2022. – Vol. 33. – № 8. – P. 1944-1953.

152. Petersen S. E. Left ventricular non-compaction: insights from cardiovascular

- magnetic resonance imaging / S. E. Petersen, J. B. Selvanayagam, F. Wiesmann [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2005. – Vol. 46. – № 1. – P. 101-105.
153. Pignatelli R. H. Clinical Characterization of Left Ventricular Noncompaction in Children / R. H. Pignatelli, C. J. McMahon, W. J. Dreyer [et al.] // *Circulation*. – 2003. – Vol. 108. – № 21. – P. 2672-2678.
154. Puchner E. M. Mechanoenzymatics of titin kinase / E. M. Puchner, A. Alexandrovich, L. K. Ay [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol. 105. – № 36. – P. 13385-13390.
155. Pugh T. J. The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing / T. J. Pugh, M. A. Kelly, S. Gowrisankar [et al.] // *Genetics in Medicine*. – 2014. – Vol. 16. – № 8. – P. 601-608.
156. Pulcastro H. C. Increased titin compliance reduced length-dependent contraction and slowed cross-bridge kinetics in skinned myocardial strips from *rbm* (20RRM) mice / H. C. Pulcastro, P. O. Awinda, M. Methawasin [et al.] // *Frontiers in physiology*. – 2016. – Vol. 7. – P. 322.
157. Radke M. H. Targeted deletion of titin N2B region leads to diastolic dysfunction and cardiac atrophy / M. H. Radke, J. Peng, Y. Wu [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – № 9. – P. 3444-3449.
158. Ramos F. J. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival / F. J. Ramos, S. C. Chen, M. G. Garelick [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2012. – Vol. 4. – № 144. – P. 103.
159. Raskin A. A novel mechanism involving four-and-a-half LIM domain protein-1 and extracellular signal-regulated kinase-2 regulates titin phosphorylation and mechanics / A. Raskin, S. Lange, K. Banares [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287. – № 35. – P. 29273-29284.
160. Raynolds M. V. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with

- ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy / M. V. Raynolds, M. R. Bristow, E. W. Bush [et al.] // *Lancet* (London, England). – 1993. – Vol. 342. – № 8879. – P. 1073-1075.
161. Refaat M. M. Genetic variation in the alternative splicing regulator RBM20 is associated with dilated cardiomyopathy / M. M. Refaat, S. A. Lubitz, S. Makino [et al.] // *Heart Rhythm*. – 2012. – Vol. 9. – № 3. – P. 390-396.
162. Richards S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / S. Richards, N. Aziz, S. Bale [et al.] // *Genetics in Medicine* 2015 17:5. – 2015. – Vol. 17. – № 5. – P. 405-423.
163. Richardson P. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies / P. Richardson, R. W. McKenna, M. Bristow [et al.] // *Circulation*. – 1996. – Vol. 93. – № 5. – P. 841-842.
164. Roberts A. M. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease / A. M. Roberts, J. S. Ware, D. S. Herman [et al.] // *Science Translational Medicine*. – 2015. – Vol. 7. – № 270. – P. 6.
165. Roncarati R. Doubly heterozygous LMNA and TTN mutations revealed by exome sequencing in a severe form of dilated cardiomyopathy / R. Roncarati, C. Viviani Anselmi, P. Krawitz [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. – 2013. – Vol. 21. – № 10. – P. 1105-1111.
166. Rudaka I. Genetic basis of early onset atrial fibrillation in patients without risk factors / I. Rudaka, B. Vilne, J. Isakova [et al.] // *Journal of cardiovascular development and disease*. – 2023. – Vol. 10. – № 3. – P. 104.
167. Satoh M. Structural analysis of the titin gene in hypertrophic cardiomyopathy: identification of a novel disease gene / M. Satoh, M. Takahashi, T. Sakamoto [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 1999. – Vol. 262. – № 2. – P. 411-417.
168. Schafer S. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the

general population / S. Schafer, A. De Marvao, E. Adami [et al.] // *Nature Genetics*. – 2017. – Vol. 49. – № 1. – P. 46-53.

169. Schiabor Barrett K. M. Cardiomyopathy prevalence exceeds 30% in individuals with TTN variants and early atrial fibrillation / K. M. Schiabor Barrett, E. T. Cirulli, A. Bolze [et al.] // *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*. – 2023. – Vol. 25. – № 4. – P. 100012.

170. Schisler J. C. Cardiac energy dependence on glucose increases metabolites related to glutathione and activates metabolic genes controlled by mechanistic target of rapamycin / J. C. Schisler, T. J. Grevengoed, F. Pascual [et al.] // *Journal of the American Heart Association*. – 2015. – Vol. 4. – № 2. – P. e001136.

171. Schweingruber C. Nonsense-mediated mRNA decay - Mechanisms of substrate mRNA recognition and degradation in mammalian cells / C. Schweingruber, S. C. Rufener, D. Zünd [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. – 2013. – Vol. 1829. – № 6-7. – P. 612-623.

172. Schwinger R. H. G. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism / R. H. G. Schwinger, M. Böhm, A. Koch [et al.] // *Circulation Research*. – 1994. – Vol. 74. – № 5. – P. 959-969.

173. Sedaghat-Hamedani F. Clinical genetics and outcome of left ventricular non-compaction cardiomyopathy / F. Sedaghat-Hamedani, J. Haas, F. Zhu [et al.].

174. Seung H. C. Association Between Titin Loss-of-Function Variants and Early-Onset Atrial Fibrillation / Seung H.C., Weng L.C., Roselli C. [et al.] // *JAMA*. – 2018. – Vol. 320. – № 22. – P. 2354-2364.

175. Shah R. A. Frequency, penetrance, and variable expressivity of dilated cardiomyopathy-associated putative pathogenic gene variants in UK Biobank Participants / R. A. Shah, B. Asatryan, G. Sharaf Dabbagh [et al.] // *Circulation*. – 2022. – Vol. 146. – № 2. – P. 110-124.

176. Shibayama J. Metabolic remodeling in moderate synchronous versus dyssynchronous pacing-induced heart failure: Integrated metabolomics and proteomics

- study / J. Shibayama, T. N. Yuzyuk, J. Cox [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – P. e0118974.
177. Siu B. L. Familial dilated cardiomyopathy locus maps to chromosome 2q31 / B. L. Siu, H. Niimura, J. A. Osborne [et al.] // Circulation. – 1999. – Vol. 99. – № 8. – P. 1022-1026.
178. Sliwa K. Peripartum cardiomyopathy. / K. Sliwa, J. Fett, U. Elkayam // Lancet. – 2006. – Vol. 368. – № 9536. – P. 687-93.
179. Sliwa K. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of peripartum cardiomyopathy: A position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology Working Group on peripartum cardiomyopathy / K. Sliwa, D. Hilfiker-Kleiner, M. C. Petrie [et al.] // European Journal of Heart Failure. – 2010. – Vol. 12. – № 8. – P. 767-778.
180. Smith N. L. Association of genome-wide variation with the risk of incident heart failure in adults of European and African ancestry: a prospective meta-analysis from the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology (CHARGE) consortium / N. L. Smith, J. F. Felix, A. C. Morrison [et al.] // Circulation. Cardiovascular genetics. – 2010. – Vol. 3. – № 3. – P. 256-266.
181. Spaendonck-Zwarts K. Y. Van. Titin gene mutations are common in families with both peripartum cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy / K. Y. Van Spaendonck-Zwarts, A. Posafalvi, M. P. Van Den Berg [et al.] // European heart journal. – 2014. – Vol. 35. – № 32. – P. 2165-2173.
182. Spaendonck-Zwarts K. Y. Van. Peripartum cardiomyopathy as a part of familial dilated cardiomyopathy / K. Y. Van Spaendonck-Zwarts, J. P. Van Tintelen, D. J. Van Veldhuisen [et al.] // Circulation. – 2010. – Vol. 121. – № 20. – P. 2169-2175.
183. Stanley W. C. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart / W. C. Stanley, F. A. Recchia, G. D. Lopaschuk // Physiological Reviews. – 2005. – Vol. 85. – № 3. – P. 1093-1129.
184. Tabish A. M. Genetic epidemiology of titin-truncating variants in the etiology of

dilated cardiomyopathy / A. M. Tabish, V. Azzimato, A. Alexiadis [et al.] // *Biophysical reviews*. – 2017. – Vol. 9. – № 3. – P. 207-223.

185. Taylor M. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes / M. Taylor, S. Graw, G. Sinagra [et al.] // *Circulation*. – 2011. – Vol. 124. – № 8. – P. 876-885.

186. Tskhovrebova L. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains* / L. Tskhovrebova, J. Trinick. – 2004.. – Vol.279. – №45. – P.46351-46354.

187. Tskhovrebova L. Roles of Titin in the Structure and Elasticity of the Sarcomere / L. Tskhovrebova, J. Trinick // *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. – 2010. – Vol. 2010. – P.612482

188. Velden J. van der. Cardiac Disorders and Pathophysiology of Sarcomeric Proteins / J. van der Velden, G. J. M. Stienen // *Physiological reviews*. – 2019. – Vol. 99. – № 1. – P. 381-426.

189. Villard E. A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy / E. Villard, C. Perret, F. Gary [et al.] // *European heart journal*. – 2011. – Vol. 32. – № 9. – P. 1065-1076.

190. Vissing C. R. Dilated cardiomyopathy caused by truncating titin variants: long-term outcomes, arrhythmias, response to treatment and sex differences / C. R. Vissing, T. B. Rasmussen, A. M. Dybro [et al.] // *Journal of Medical Genetics*. – 2021. – Vol. 58. – № 12. – P. 832 - 841.

191. Ware J. S. Genetic etiology for alcohol-induced cardiac toxicity / J. S. Ware, A. Amor-Salamanca, U. Tayal [et al.] // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2018. – Vol. 71. – № 20. – P. 2293-2302.

192. Ware J. S. Role of titin in cardiomyopathy: From DNA variants to patient stratification / J. S. Ware, S. A. Cook // *Nature Reviews Cardiology*. – 2018. – Vol. 15. – № 4. – P. 241-252.

193. Watanabe T. Alternative splicing regulator RBM20 and cardiomyopathy / T. Watanabe, A. Kimura, H. Kuroyanagi // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2018. –

Vol. 5. – P. 105.

194. Xie S. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications / S. Xie, S.-C. Xu, W. Deng [et al.] // *Signal transduction and targeted therapy*. – 2023. – Vol. 8. – № 1. – P. 114.

195. Xu Y. C. Less is more, natural loss-of-function mutation is a strategy for adaptation / Y. C. Xu, Y. L. Guo // *Plant Communications*. – 2020. – Vol. 1. – № 6. – P. 100103.

196. Yamasaki R. Protein kinase A phosphorylates titin's cardiac-specific N2B domain and reduces passive tension in rat cardiac myocytes / R. Yamasaki, Y. Wu, M. McNabb [et al.] // *Circulation Research*. – 2002. – Vol. 90. – № 11. – P. 1181-1188.

197. Yano T. Clinical impact of myocardial mTORC1 activation in nonischemic dilated cardiomyopathy / T. Yano, S. Shimoshige, T. Miki [et al.] // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2016. – Vol. 91. – P. 6-9.

198. Yoneda Z. T. Early-onset atrial fibrillation and the prevalence of rare variants in cardiomyopathy and arrhythmia genes / Z. T. Yoneda, K. C. Anderson, J. A. Quintana [et al.] // *JAMA cardiology*. – 2021. – Vol. 6. – № 12. – P. 1371-1379.

199. Yoskovitz G. A novel titin mutation in adult-onset familial dilated cardiomyopathy / G. Yoskovitz, Y. Peled, M. Gramlich [et al.] // *The American journal of cardiology*. – 2012. – Vol. 109. – № 11. – P. 1644-1650.

200. Zhang C. Titin-truncating variants increase the risk of cardiovascular death in patients with hypertrophic cardiomyopathy / C. Zhang, H. Zhang, G. Wu [et al.] // *The Canadian journal of cardiology*. – 2017. – Vol. 33. – № 10. – P. 1292-1297.

201. Zhou J. Titin truncations lead to impaired cardiomyocyte autophagy and mitochondrial function in vivo / J. Zhou, B. Ng, N. S. J. Ko [et al.] // *Human molecular genetics*. – 2019. – Vol. 28. – № 12. – P. 197-1981.

202. Zhu C. Insulin regulates titin pre-mRNA splicing through the PI3K-Akt-mTOR kinase axis in a RBM20-dependent manner / C. Zhu, Z. Yin, B. Tan [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. – 2017. – Vol. 1863. – № 9. – P. 2363-2371.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1. Список исследованных генов и их локализация у пациентов с кардиомиопатиями

Ген	Интервал	Покрытие
<i>ABCC9</i>	chr12:21801034 – 21936684	100.0
<i>ACADVL</i>	chr17:7217136 – 7225107	100.0
<i>ACTA1</i>	chr1:229431489 – 229433125	100.0
<i>ACTC1</i>	chr15:34790402 – 34794818	100.0
<i>ACTN2</i>	chr1:236686664 – 236762629	100.0
<i>ACVR2B</i>	chr3:38454313 – 38483342	100.0
<i>AGK</i>	chr7:141555457 – 141652934	100.0
<i>AKAP9</i>	chr7:91941090 – 92110169	100.0
<i>ALPK3</i>	chr15:84816837 – 84868466	100.0
<i>ANK2</i>	chr4:112904484 – 113381650	100.0
<i>ANKRD1</i>	chr10:90912856 – 90921037	100.0
<i>ANO5</i>	chr11:22193483 – 22279775	100.0
<i>BAG3</i>	chr10:119651666 – 119677292	100.0
<i>BRAF</i>	chr7:140726484 – 140924713	100.0
<i>CACNA1C</i>	chr12:1971053 – 2691209	100.0
<i>CACNA2D1</i>	chr7:81950382 – 82443469	100.0
<i>CACNB2</i>	chr10:18140727 – 18539734	100.0
<i>CALM1</i>	chr14:90397221 – 90404727	100.0
<i>CALM2</i>	chr2:47160766 – 47176551	100.0
<i>CALM3</i>	chr19:46601425 – 46609163	100.0
<i>CALR3</i>	chr19:16479121 – 16496139	100.0
<i>CASQ2</i>	chr1:115701231 – 115768551	100.0
<i>CAV3</i>	chr3:8733867 – 8745877	100.0
<i>CBL</i>	chr11:119206408 – 119308087	100.0
<i>CDH2</i>	chr18:27952143 – 28177032	100.0
<i>CMYA5</i>	chr5:79689898 – 79799626	100.0
<i>CRELD1</i>	chr3:9934429 – 9944589	100.0
<i>CRYAB</i>	chr11:111908754 – 111911734	100.0
<i>CSRP3</i>	chr11:19182660 – 19192458	100.0
<i>CTNNA3</i>	chr10:65920320 – 67648780	100.0
<i>DES</i>	chr2:219418453 – 219426000	100.0
<i>DMD</i>	chrX:31121823 – 33339275	100.0
<i>DMPK</i>	chr19:45770472 – 45782381	100.0
<i>DNAAF1</i>	chr16:84145432 – 84178416	100.0
<i>DNAAF3</i>	chr19:55159051 – 55166658	100.0
<i>DPP6</i>	chr7:153887675 – 154892492	100.0
<i>DSC2</i>	chr18:31068005 – 31101982	100.0

<i>DSG2</i>	chr18:31498243 – 31546754	100.0
<i>DSP</i>	chr6:7541906 – 7585888	100.0
<i>DTNA</i>	chr18:34755967 – 34890450	100.0
<i>DYSF</i>	chr2:71453989 – 71686502	100.0
<i>EMD</i>	chrX:154379476 – 154381207	100.0
<i>EYA4</i>	chr6:133274772 – 133531238	100.0
<i>FHL1</i>	chrX:136196795 – 136210037	100.0
<i>FHL2</i>	chr2:105361273 – 105399555	100.0
<i>FHOD3</i>	chr18:36297826 – 36779540	100.0
<i>FKRP</i>	chr19:46755441 – 46756948	100.0
<i>FKTN</i>	chr9:105575023 – 105640133	100.0
<i>FLNA</i>	chrX:154348839 – 154371255	100.0
<i>FLNC</i>	chr7:128830628 – 128858533	100.0
<i>FXN</i>	chr9:69035773 – 69099944	100.0
<i>GAA</i>	chr17:80104577 – 80119341	100.0
<i>GATA4</i>	chr8:11708303 – 11758485	100.0
<i>GATA5</i>	chr20:62464826 – 62475531	100.0
<i>GATA6</i>	chr18:22171135 – 22200833	100.0
<i>GATAD1</i>	chr7:92447720 – 92456572	100.0
<i>GDF1</i>	chr19:18868587 – 18870317	100.0
<i>GJA5</i>	chr1:147758152 – 147759248	100.0
<i>GLA</i>	chrX:101397799 – 101407913	100.0
<i>GPD1L</i>	chr3:32106702 – 32165920	100.0
<i>HAND1</i>	chr5:154475796 – 154478018	100.0
<i>HCN4</i>	chr15:73322471 – 73368280	100.0
<i>HFE</i>	chr6:26087431 – 26094421	100.0
<i>HRAS</i>	chr11:532627 – 534333	100.0
<i>ILK</i>	chr11:6604262 – 6610621	100.0
<i>ISPD</i>	chr7:16091685 – 16421332	100.0
<i>JPH2</i>	chr20:44114786 – 44186715	100.0
<i>JUP</i>	chr17:41755734 – 41771864	100.0
<i>KCNA5</i>	chr12:5044138 – 5045999	100.0
<i>KCND3</i>	chr1:111776067 – 111982736	100.0
<i>KCNE1</i>	chr21:34449235 – 34449644	100.0
<i>KCNE2</i>	chr21:34370469 – 34370860	100.0
<i>KCNE3</i>	chr11:74457242 – 74457573	100.0
<i>KCNE5</i>	chrX:109624582 – 109625030	100.0
<i>KCNH2</i>	chr7:150945355 – 150977923	100.0
<i>KCNJ2</i>	chr17:70175030 – 70176333	100.0
<i>KCNJ5</i>	chr11:128911264 – 128916741	100.0
<i>KCNJ8</i>	chr12:21765713 – 21773626	100.0
<i>KCNQ1</i>	chr11:2444676 – 2848013	100.0
<i>KRAS</i>	chr12:25209785 – 25245394	100.0

<i>LAMA4</i>	chr6:112109427 – 112254161	100.0
<i>LAMP2</i>	chrX:120428474 – 120469179	100.0
<i>LDB3</i>	chr10:86668682 – 86732986	100.0
<i>LEFTY2</i>	chr1:225937411 – 225941150	100.0
<i>LMNA</i>	chr1:156114908 – 156139848	100.0
<i>LMOD3</i>	chr3:69109085 – 69122396	100.0
<i>LRRC10</i>	chr12:69609995 – 69610848	100.0
<i>LZTR1</i>	chr22:20982362 – 20997358	100.0
<i>MAP2K1</i>	chr15:66387338 – 66490625	100.0
<i>MAP2K2</i>	chr19:4090588 – 4123885	100.0
<i>MIB1</i>	chr18:21741574 – 21864676	100.0
<i>MMP21</i>	chr10:125766652 – 125775831	100.0
<i>MRAS</i>	chr3:138372874 – 138402279	100.0
<i>MYBPC3</i>	chr11:47331861 – 47352657	100.0
<i>MYBPHL</i>	chr1:109294229 – 109307001	100.0
<i>MYH6</i>	chr14:23382030 – 23407233	100.0
<i>MYH7</i>	chr14:23412844 – 23433742	100.0
<i>MYL2</i>	chr12:110911069 – 110920542	100.0
<i>MYL3</i>	chr3:46858234 – 46863400	100.0
<i>MYL4</i>	chr17:47209413 – 47223052	100.0
<i>MYLK2</i>	chr20:31819571 – 31833807	100.0
<i>MYOF</i>	chr10:93306953 – 93482204	100.0
<i>MYOM1</i>	chr18:3067253 – 3215234	100.0
<i>MYOT</i>	chr5:137870642 – 137887395	100.0
<i>MYOZ2</i>	chr4:119136515 – 119186210	100.0
<i>MYPN</i>	chr10:68106716 – 68210465	100.0
<i>NEBL</i>	chr10:20785737 – 21173843	100.0
<i>NEXN</i>	chr1:77916098 – 77942924	100.0
<i>NF1</i>	chr17:31095197 – 31378941	100.0
<i>NKX2-5</i>	chr5:173232559 – 173235093	100.0
<i>NKX2-6</i>	chr8:23702441 – 23706608	100.0
<i>NPPA</i>	chr1:11845993 – 11847694	100.0
<i>NRAS</i>	chr1:114708525 – 114716170	100.0
<i>NUP155</i>	chr5:37291890 – 37370987	100.0
<i>PDLIM3</i>	chr4:185502284 – 185535444	100.0
<i>PKDIL1</i>	chr7:47775133 – 47948450	100.0
<i>PKP2</i>	chr12:32792414 – 32896741	100.0
<i>PLEC</i>	chr8:143916167 – 143975379	100.0
<i>PLEKHM2</i>	chr1:15684549 – 15733944	100.0
<i>PLN</i>	chr6:118558912 – 118559090	100.0
<i>PPA2</i>	chr4:105369715 – 105474060	100.0
<i>PPP1CB</i>	chr2:28752115 – 28799313	100.0
<i>PRDM16</i>	chr1:3069250 – 3433821	100.0

<i>PRKAG2</i>	chr7:151557191 – 151876630	100.0
<i>PSEN1</i>	chr14:73148010 – 73219299	100.0
<i>PSEN2</i>	chr1:226880636 – 226895589	100.0
<i>PTPN11</i>	chr12:112419102 – 112504774	100.0
<i>RAF1</i>	chr3:12584503 – 12618732	100.0
<i>RANGRF</i>	chr17:8288779 – 8289946	100.0
<i>RBM20</i>	chr10:110644445 – 110835988	100.0
<i>RIT1</i>	chr1:155900378 – 155910895	100.0
<i>RRAS</i>	chr19:49635567 – 49640108	100.0
<i>RYR2</i>	chr1:237042511 – 237832657	100.0
<i>SALL4</i>	chr20:51784255 – 51802418	100.0
<i>SCN10A</i>	chr3:38697331 – 38794020	100.0
<i>SCN1B</i>	chr19:35030812 – 35039711	100.0
<i>SCN2B</i>	chr11:118166878 – 118176441	100.0
<i>SCN3B</i>	chr11:123634133 – 123653812	100.0
<i>SCN4B</i>	chr11:118137018 – 118152683	100.0
<i>SCN5A</i>	chr3:38550311 – 38633317	100.0
<i>SCNN1G</i>	chr16:23186262 – 23215479	100.0
<i>SDHA</i>	chr5:218347 – 256431	100.0
<i>SGCD</i>	chr5:156329567 – 156759400	100.0
<i>SHOC2</i>	chr10:110964349 – 111011828	100.0
<i>SLMAP</i>	chr3:57757642 – 57927398	100.0
<i>SNTA1</i>	chr20:33408497 – 33443630	100.0
<i>SOS1</i>	chr2:38985815 – 39120432	100.0
<i>SOS2</i>	chr14:50118334 – 50231293	100.0
<i>SPEG</i>	chr2:219434968 – 219498199	100.0
<i>SPRED1</i>	chr15:38253177 – 38351674	100.0
<i>SYNE1</i>	chr6:152122426 – 152628341	100.0
<i>SYNM</i>	chr15:99105190 – 99133068	100.0
<i>SYNPO2L</i>	chr10:73646708 – 73655932	100.0
<i>TAZ</i>	chrX:154411834 – 154421014	100.0
<i>TBX20</i>	chr7:35202420 – 35253630	100.0
<i>TBX5</i>	chr12:114355522 – 114403908	100.0
<i>TCAP</i>	chr17:39665350 – 39666119	100.0
<i>TECRL</i>	chr4:64277025 – 64409361	100.0
<i>TGFB3</i>	chr14:75959177 – 75980903	100.0
<i>TMEM43</i>	chr3:14125184 – 14141805	100.0
<i>TMPO</i>	chr12:98515860 – 98547870	100.0
<i>TNNC1</i>	chr3:52451265 – 52454025	100.0
<i>TNNI3</i>	chr19:55151826 – 55157600	100.0
<i>TNNI3K</i>	chr1:74235442 – 74543992	100.0
<i>TNNT2</i>	chr1:201359200 – 201373264	100.0
<i>TPM1</i>	chr15:63042820 – 63071182	100.0

<i>TRDN</i>	chr6:123218591 – 123636785	100.0
<i>TRPM4</i>	chr19:49157857 – 49211508	100.0
<i>TTN</i>	chr2:178527002 – 178804652	100.0
<i>TTR</i>	chr18:31591893 – 31598685	100.0
<i>VCL</i>	chr10:73998198 – 74118179	100.0
<i>ZIC3</i>	chrX:137566682 – 137577281	100.0