

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИМЕНИ В. А. АЛМАЗОВА»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**КОСТАРЕВА  
АННА АЛЕКСАНДРОВНА**

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

14.01.05 — кардиология

03.02.07 — генетика

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

**Научные консультанты:**

доктор медицинских наук, профессор, акад. РАН Е. В. Шляхто  
профессор Томас Сеершен, MD, PhD, (Швеция)

Санкт-Петербург

2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	8
Глава 1. Обзор литературы.....	19
1.1. Идиопатическая рестриктивная кардиомиопатия и спектр ее генетических причин.....	19
1.2. Кардиомиопатии и нейромышечные заболевания.....	27
1.3. Особенности течения сердечной недостаточности и прогноз для пациентов с РКМП.....	34
1.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене десмина ( <i>DES</i> ).....	41
1.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене ламина А/С ( <i>LMNA</i> ).....	47
1.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене сердечного тропонина I ( <i>TNNI3</i> ).....	51
1.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции.....	56
1.8. Перспективы дальнейших научных исследований.....	60
Глава 2. Материалы и методы.....	63
2.1. Формирование группы пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией (РКМП).....	63
2.2. Формирование группы пациентов с ХСН с целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа.....	64
2.3. Секвенирование нового поколения.....	64
2.4. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена десмина, для последующей генетической модификации мышечных клеток.....	69

2.5. Клонирование гена десмина с использованием конструкции на основе лентивирусного вектора .....	69
2.6. Мутагенез на основе плазмиды с геном десмина.....	72
2.7. Продукция лентивирусных конструкций, содержащих ген десмина ..	74
2.8. Получение индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) и их дифференцировка в кардиогенном направлении .....	75
2.9. Получение первичной культуры мышечных клеток мыши .....	76
2.10. Культивирование клеток линии C2C12 и миогенная дифференцировка сателлитных клеток и клеток линии C2C12 .....	77
2.11. Трансдукция первичных миофибрилл мыши и клеток линии C2C12 лентивирусными конструкциями .....	78
2.12. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток.....	79
2.13. ПЦР в реальном времени для определения экспрессии миогенных маркеров .....	80
2.14. Оценка внутримитохондриального уровня кальция.....	81
2.14.1. Применение флюоресцентных красителей и стимуляция митохондриального захвата кальция .....	81
2.14.2. Конфокальная лазерная микроскопия.....	81
2.15. Исследование функции клеточного дыхания в культуре клеток с использованием прибора «Sea horse» .....	82
2.16. Исследование функции потенциалзависимого натриевого канала (Nav1.5) с помощью методики локальной фиксации мембранного потенциала.....	83
2.17. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена <i>LMNA</i> , для последующей модификации мезенхимных стволовых клеток .....	84
2.18. Культивирование ММСК и их дифференцировка .....	85
2.19. Подсчет эффективности дифференцировки .....	85
2.20. Определение колониобразующей способности ММСК методом предельных разведений .....	86
2.21. Анализ экспрессии остеогенных и адипогенных маркеров .....	86

2.22. Множественный анализ экспрессии генов.....	87
2.23. Вестерн-блоттинг с применением антител к ламину A/C и оценка общей активности гистоновых деацетилаз .....	88
2.24. Конструирование вектора и мутагенез мутантных форм гена <i>TNNI3</i> .....	89
2.25. Выделение белка для исследований <i>in vitro</i> .....	90
2.26. Коседиментация .....	91
2.27. Поверхностный плазмонный резонанс.....	92
2.28. Оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в восстановленном комплексе и силы сокращения изолированных миофибрилл .....	93
2.29. Определение аллелей и генотипов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.....	94
2.30. Статистическая обработка данных .....	94
2.30.1. Статистическая обработка данных ПЦР в реальном времени.....	94
2.30.2. Статистическая обработка данных генотипирования и сравнение частот единичных нуклеотидных полиморфизмов .....	95
2.30.3. Статистическая обработка данных расчета риска исхода ХСН с применением расчетных шкал.....	96
Глава 3. Клиническая характеристика пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией .....	97
3.1. Описание исследуемой когорты пациентов .....	97
3.2. Анализ кривых выживаемости пациентов с РКМП.....	106
3.3. Анализ возможности использования шкал прогноза ХСН в когорте пациентов с идиопатической РКМП .....	110
Глава 4. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии .....	123

4.1. Качество проведенного секвенирования, глубина покрытия и классификация новых и ранее описанных генетических вариантов .....	123
4.2. Анализ генетических вариантов в соответствии с классификацией ACMG .....	124
4.3. Моделирование основных белковых взаимодействий и сигнальных связей, ассоциированных с РКМП .....	140
4.4. Анализ влияния патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе пациентов с РКМП на клиническое течение заболевания...	142
Глава 5. Исследование генетической этиологии РКМП в сочетании с признаками поражения нейромышечной системы .....	146
5.1. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене <i>DES</i> .....	149
5.2. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене <i>BAG3</i> .....	153
5.3. РКМП, ассоциированные с мутациями в гене <i>FLNC</i> .....	156
Глава 6. Разработка оптимальной схемы генетической диагностики у пациентов с идиопатической РКМП .....	164
Глава 7. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена десмина <i>DES</i> .....	169
7.1. Оценка влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального $Ca^{2+}$ в первичной культуре мышечных клеток .....	169
7.2. Эффект мутаций гена десмина на внутримитохондриальный захват кальция под воздействием электрического тока .....	170
7.3. Влияние мутаций гена десмина на внутримитохондриальный захват кальция вследствие активации рианодинового рецептора .....	172
7.4. Эффект мутаций гена десмина на уровень цитоплазматического кальция .....	173
7.5. Оценка методом «Sea horse» функции клеточного дыхания в культуре миотрубок после трансдукции нормальными и мутантными формами гена десмина.....	175

7.6.	Оценка функции потенциалзависимых натриевых каналов (Nav1.5) в кардиомиоцитах, несущих с.735+1G>A мутацию в гене <i>DES</i> .....	178
Глава 8. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена <i>LMNA</i> .....		
8.1.	Характеристика мезенхимных стволовых клеток и уровень экспрессии <i>LMNA</i> после лентивирусной трансдукции .....	180
8.2.	Влияние мутации гена ламина на колониюобразующую способность ММСК.....	182
8.3.	Влияние мутаций гена ламина на адипогенную и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток.....	183
8.4.	Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров адипогенной дифференцировки ММСК .....	184
8.5.	Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров остеогенной дифференцировки ММСК .....	185
8.6.	Влияние мутации <i>LMNA</i> на экспрессионный профиль при дифференцировке ММСК .....	187
8.7.	Оценка влияния мутаций гена <i>LMNA</i> на дифференцировку сателлитных мышечных клеток в миогенном направлении и формирование миотрубок.....	198
8.8.	Влияние мутаций <i>LMNA</i> на экспрессию маркеров миогенной дифференцировки .....	202
8.9.	Эффект мутаций <i>LMNA</i> на активность гистондеацетилазы .....	204
Глава 9. Изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена тропонина I ( <i>TNNI3</i> ).....		
9.1.	Клиническая картина РКМП на фоне мутаций в гене <i>TNNI3</i> .....	206
9.2.	Исследование взаимодействия мутантных форм тропонина I с белками тонких филаментов методом коседиментации и плазмонного резонанса .....	212
9.3.	Оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы .....	214

9.4. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа у пациентов с ХСН .....	217
Глава 10. Обсуждение .....	232
10.1. Особенности клинического течения и информативность шкал расчета риска ХСН при идиопатической РКМП в различных возрастных группах .....	232
10.2. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии .....	238
10.3. Исследование генетической этиологии РКМП, протекающей в сочетании с поражением нейромышечной системы .....	244
10.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене <i>DES</i> .....	254
10.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене <i>LMNA</i> .....	259
10.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене <i>TNNI3</i> .....	265
10.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции .....	269
Выводы .....	274
Практические рекомендации .....	276
Список условных сокращений .....	278
Список литературы .....	282

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

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

Рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) характеризуется наличием рестриктивного фенотипа по данным ЭхоКГ в сочетании с нормальным или незначительно уменьшенным размером одного или обоих желудочков, нормальной или почти нормальной систолической функцией и нормальной или незначительно увеличенной толщиной стенок левого желудочка (ЛЖ) [287, 343]. В основе развития РКМП может лежать множество патологических состояний с поражением миокарда в качестве ведущего или одного из симптомов. Часто РКМП носит наследственный, генетически обусловленный характер, при этом заболевание может являться частью более сложных наследственных синдромов с вовлечением многих систем и органов [9, 37, 47, 287]. Нередко генетически обусловленные РКМП сочетаются с нейромышечными заболеваниями, при этом кардиальный фенотип может быть ведущим в клинической картине, а поражение



периферических мышц субклиническим (десминопатии, ламинопатии) [62, 275, 404]. РКМП может являться одним из проявлений болезней накопления и инфильтративных заболеваний, например, болезни Гоше, болезни Фабри, гемохроматоза, болезни Помпе, болезни Неймана–Пика, а также частью наследственного кардиофациального синдрома Нунана или генетически обусловленных форм амилоидоза [25, 28]. Дифференциальная диагностика рестриктивного фенотипа сложна и требует проведения большого количества специальных диагностических тестов и процедур [126, 267].

В настоящее время определение генетических дефектов, лежащих в основе развития кардиомиопатий, внедряется в клиническую практику с целью генетического консультирования, пренатальной диагностики и ранней постановки диагноза бессимптомным носителям мутаций [46, 161, 257, 326]. Однако попытки провести корреляции между генотипом и фенотипическими проявлениями мутации и прогнозом заболевания не привели к значительным результатам. Поэтому использование данных генетического анализа в клинической практике все еще является ограниченным и не позволяет развивать подходы персонализированной терапии. В настоящее время в научную и клиническую практику внедряется секвенирование нового поколения (массовое параллельное секвенирование), которое позволяет одновременно скринировать сотни генов и идентифицировать множество причинных мутаций и ассоциированных генетических вариантов. Это приводит к появлению новых данных о комплексном взаимодействии нескольких мутаций и суммации их эффекта в патогенезе повреждения миокарда. Именно появление секвенирования нового поколения и одновременное описание комплексных генетических дефектов позволят выявлять те универсальные внутриклеточные процессы, обуславливающие развитие того или иного типа дисфункции кардиомиоцитов и миоцитов. Результатом данных исследований должно явиться определение новых внутриклеточных мишеней, которые могут стать основой для персонализированной терапии данной тяжелой группы заболеваний. Перспективным направлением в области изучения кардиомиопатий является выработка шкал расчета риска и прогноза для пациентов

с учетом их индивидуальных генетических особенностей, причинных патогенных вариантов, семейного анамнеза и клинической картины заболевания.

Расширение спектра генетических причин идиопатической РКМП позволило предполагать, что полиморфные варианты ряда генов могут являться факторами, ассоциированными с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока при хронической сердечной недостаточности (ХСН), не имеющей наследственного генеза. Исследованию генетических детерминант, ассоциированных с развитием диастолической дисфункции миокарда и сердечной недостаточности с сохранной фракцией выброса (СН-сФВ) при мультифакториальных заболеваниях сердечно-сосудистой системы — гипертонической болезни, ишемической болезни сердца (ИБС), диабетической кардиопатии — посвящено ограниченное количество работ, в то время как ассоциация определенных генетических детерминант с развитием сердечной недостаточности с низкой фракцией выброса (СН-нФВ) неоднократно была продемонстрирована [92, 316, 378, 413, 433]. Поскольку наличие рестриктивного типа кровенаполнения левого желудочка при СН-сФВ является фактором неблагоприятного прогноза и определяет темпы прогрессирования атриомегалии и риск развития наджелудочковых нарушений ритма у пациентов с ХСН приобретенного генеза, выявление генетических детерминант, определяющих развитие рестриктивного типа ремоделирования и диастолической дисфункции, является актуальной научной и клинической задачей.

### **Степень разработанности проблемы**

Поскольку рестриктивная кардиомиопатия является одной из наиболее редких форм кардиомиопатий, а идиопатическая ее форма диагностируется крайне редко, изучение спектра генетических причин данной формы кардиомиопатий до настоящего времени было затруднено. Наибольшей когортой больных с охарактеризованной генетической природой заболевания на сегодняшний момент является группа больных из исследования P. Elliotte и соавторов, в которой

исследование мутаций только саркомерных генов (*MYH7*, *ACTC*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*) было проведено в группе из 12 человек [197]. При этом данных о распространенности дефектов генов белков цитоскелета и ядерной оболочки, а также особенностей генетических детерминант рестриктивной кардиомиопатии в разных возрастных группах в настоящий момент в литературе не существует. Поэтому актуальность проведения данного исследования с применением технологии массового параллельного секвенирования — наиболее современного метода генетического анализа — в группах больных с дебютом заболевания в разных возрастных группах представляется несомненной. В настоящее время существует лишь ограниченное число таких работ в данной области, однако их количество будет нарастать в течение следующих 3–5 лет.

Все вышесказанное и предопределило постановку следующей цели исследования.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

1. С помощью технологии секвенирования нового поколения охарактеризовать спектр генетических причин, приводящих к развитию идиопатической рестриктивной кардиомиопатии.
2. На основании клинических данных и функциональных методов исследования определить особенности клинического течения, спектр нарушений ритма сердца, динамику ремоделирования миокарда и развития сердечной

недостаточности у больных с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в зависимости от генетической причины заболевания.

3. Выявить особенности клинического течения и генетической природы заболевания у пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией с дебютом заболевания в детском возрасте.
4. Установить особенности клинического течения заболевания и спектр генетических причин в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в сочетании с нейромышечной патологией.
5. Оценить возможность использования различных шкал расчета прогноза течения хронической сердечной недостаточности в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией.
6. В моделях *in vitro* изучить молекулярно-генетические механизмы развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене десмина.
7. С использованием клеточных моделей исследовать молекулярно-генетические механизмы патогенеза кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена ламина A/C.
8. На молекулярном уровне *in vitro* проанализировать нарушения функции саркомера, возникающие вследствие мутаций в гене тропонина I, ассоциированных с развитием идиопатической рестриктивной кардиомиопатией.
9. Выявить генетические детерминанты, ассоциированные с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного фенотипа, в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью, развившейся на фоне гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и/или ожирения.

## Научная новизна исследования

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

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

Получены новые данные о влиянии мутаций гена десмина на функцию клеточного дыхания, митохондриальный захват кальция и продукцию АТФ. Впервые показано влияние мутаций гена ламина А/С на дифференцировку стромальных мультипотентных клеток-предшественников в миогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, а также продемонстрировано нарушение эпигенетической регуляции стромальных стволовых клеток под

влиянием мутаций в гене ламина. Раскрыты новые молекулярно-генетические механизмы влияния мутаций R170G и R170W в гене тропонина I на чувствительность сократительных миофиламентов к ионам кальция и показана роль белка MYBPC3 в реализации эффекта данных мутаций.

### **Теоретическая и практическая значимость результатов исследования**

Представленные клиничко-генетические корреляции течения РКМП в детской и взрослой группах пациентов могут быть использованы для определения прогноза заболевания и показаний для проведения медико-генетического консультирования. Описанная впервые клиническая форма РКМП в сочетании с врожденной миопатией расширяет спектр известных на сегодняшний момент форм филаминопатий и кардиомиопатий с нейромышечной симптоматикой, что имеет практическое значение для дифференциально-диагностического поиска. С учетом высокой частоты сочетания идиопатической РКМП с нейромышечными заболеваниями (29%), в работе обоснована целесообразность проведения расширенного неврологического обследования пациентов с оценкой функции скелетной мускулатуры.

Выявленный высокий риск развития синдрома внезапной смерти (ВС) в группе пациентов с идиопатической РКМП, ассоциированной с мутациями в генах белков саркомера, обосновывает необходимость разработки специальных показаний для имплантации кардиовертера-дефибриллятора в данной группе пациентов.

Предложена схема генетической диагностики у пациентов с идиопатической и РКМП и обоснованы показания к ее использованию и принципы ее применения.

Выявленные новые молекулярные и клеточные механизмы развития рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутациями в генах десмина, ламина и тропонина, имеют существенное значение для расширения представлений о патогенезе генетически-обусловленных форм кардиомиопатий. Определение генетических детерминант, ассоциированных с развитием сердечной недостаточности с сохранной фракцией выброса в когорте из 380 пациентов,

подтверждает значение генетических предикторов гипертрофии миокарда в развитии диастолической дисфункции.

### **Методология и методы исследования**

В исследовании были использованы методы одномоментного анализа и проспективного наблюдения. Формирование когорты пациентов с идиопатической РКМП происходило на основании критериев включения и невключения. Главным критерием включения являлся диагноз идиопатической РКМП, который устанавливался в соответствии с критериями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и классификацией Европейского общества кардиологов (ESC) 1996 года [343]. В ходе базового клинического обследования проводилась верификация диагноза, исключение приобретенных причин РКМП. Критериями невключения являлись наличие установленных приобретенных причин РКМП, таких как AL-амилоидоз, констриктивный перикардит, карциноид, предшествующее лучевое воздействие. В детскую группу были включены пациенты с РКМП, у которых дебют заболевания состоялся в возрасте до 18 лет. В основную исследуемую группу вошли 35 пациентов с идиопатической РКМП, проходивших обследование и лечение на базе кардиологических отделений и отделений педиатрии ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова», а также клиники Кафедры факультетской терапии с курсом эндокринологии ПСПбГМУ им. академика И. П. Павлова в течение 2001–2018 гг. Определение причинной роли выявленных генетических вариантов проводилось в соответствии с классификацией Американской ассоциации медицинской генетики (ACMG) и рекомендациями Российского общества медицинской генетики [39, 342].

При формировании группы пациентов с ХСН с целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов с развитием рестриктивного фенотипа критерием включения в группу являлось наличие у пациента ХСН в соответствии с критериями Европейского общества кардиологов 2016 года [323], развившейся на фоне артериальной гипертензии, факторов кардиометаболического риска, а также

ИБС. Критериями невключения в группу являлись: наличие идиопатических форм КМП, наличие КМП, ассоциированных с системными заболеваниями, транстиретиновым и AL-амилоидозом, наличие миокардита, наличие перенесенного инфаркта миокарда (ИМ), наличие постоянной формы ФП. В анализируемую группу вошло 334 пациента с ХСН. В качестве контрольной группы были обследованы здоровые доноры в возрасте 18–50 лет.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. При рестриктивной кардиомиопатии доля пациентов с положительными результатами генотипирования составляет 74%, патогенные и условно-патогенные генетические варианты определяются в генах саркомерных и цитоскелетных белков, а в 22% случаев причиной развития заболевания является сочетание патогенных вариантов в генах саркомерных белков с вариантами неопределенной значимости в генах белков цитоскелета; наиболее частой причиной развития генетически обусловленной рестриктивной кардиомиопатии являются мутации в гене *FLNC*, составляющие 20%.
2. Генотип пациента с причинными вариантами в генах саркомерных белков ассоциирован с низкими показателями десятилетней выживаемости и развитием синдрома внезапной смерти. Наихудший прогноз рестриктивной кардиомиопатии в течение первых пяти лет от начала заболевания определяется в группе пациентов с дебютом клинической симптоматики в возрасте до 5 лет. В группе пациентов с рестриктивной кардиомиопатией и дебютом заболевания в возрасте старше 18 лет неблагоприятный прогноз заболевания определяется наличием постоянной формы фибрилляции предсердий.
3. Признаки нейромышечной патологии наблюдаются в 29% случаев рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированы с мутациями в генах цитоскелетных белков и клиническим дебютом кардиомиопатии в детском возрасте. Наиболее частой причиной развития рестриктивной кардиомиопатии



в сочетании с нейромышечной патологией являются патогенные и вероятно-патогенные варианты в гене *FLNC*, составляя 60%.

4. Шкалы SHFM, MAGGIC, 3C-HF и MUSIC для расчета риска неблагоприятного исхода хронической сердечной недостаточности являются информативными в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией. Наибольшей чувствительностью и специфичностью в данной группе пациентов обладают шкалы, учитывающие фактор наличия постоянной формы фибрилляции предсердий и структурные параметры левого предсердия.
5. Мутации в гене десмина (*DES*) ассоциированы с нарушением структуры и функции митохондрий, снижением функции клеточного дыхания и продукции АТФ. Одним из механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена ламина А/С (*LMNA*), является нарушение способности к тканеспецифичной дифференцировке стромальных стволовых клеток и нарушение функции гистоновых деацетилаз. Молекулярные эффекты мутаций в гене тропонина I (*TNNI3*), ассоциированные с развитием рестриктивной кардиомиопатии, обусловлены усилением биохимической связи тропонина с тропомиозином и увеличением чувствительности тонких филаментов к ионам кальция.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на российских и международных научных конференциях и симпозиумах: Конгрессы Европейского общества кардиологов (2009–2018), Российский национальный конгресс кардиологов (2010–2018), Конференции рабочей группы Европейского общества кардиологов по заболеваниям миокарда и перикарда (2010–2018). Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания «Создание тест-систем для выявления заболеваний сердечно-сосудистой системы

наследственной природы» 2012–2014 гг., «Разработка новых молекулярно-генетических подходов для диагностики кардиомиопатий с целью подбора персонифицированной терапии и оценки прогноза» 2015–2017 гг., «Разработка методов редактирования генома при нейромышечных заболеваниях в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы» 2015–2017 гг.

По результатам исследования опубликовано 35 полнотекстовых печатных работ как в отечественных, так и в зарубежных изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» Высшей аттестационной комиссии при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и более 20 тезисов в сборниках трудов научных конференций.

### **Объем и структура диссертации**

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

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Идиопатическая рестриктивная кардиомиопатия и спектр ее генетических причин

В соответствии с определением ВОЗ кардиомиопатиями являются заболевания миокарда, приводящие к дисфункции сердечной мышцы, развитию синдрома сердечной недостаточности, аритмий и внезапной смерти [343]. В настоящее время актуальными являются две классификации кардиомиопатий — классификация Американского общества кардиологов [267] и классификация Европейского общества кардиологов [126]. Главным принципом, положенным в основу Американской классификации, является этиологический. В соответствии с данной классификацией, среди кардиомиопатий выделяют группы генетически обусловленных (гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), аритмогенная кардиомиопатия (АКМП), синдром некомпактного левого желудочка (НЛЖ)), приобретенных (поствоспалительные, кардиомиопатии у детей, рожденных от матерей с сахарным диабетом) и смешанных кардиомиопатий (рестриктивная кардиомиопатия (РКМП), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП)). В основу Европейской классификации положен морфологический принцип, в соответствии с которым в зависимости от типа ремоделирования миокарда выделяют ГКМП, ДКМП, РКМП, АКМП и НЛЖ. При всех перечисленных морфологических вариантах различают генетически обусловленные и семейные, а также генетически не обусловленные формы заболевания. Среди генетически обусловленных форм заболевания могут выделяться семейные или спорадические случаи, случаи с известным или не идентифицированным генетическим дефектом. Таким образом, важность установления генетической природы заболевания определена в обеих современных классификациях. Важно подчеркнуть, что в Американской классификации до настоящего времени сохранено понятие «вторичных» кардиомиопатий — кардиомиопатий, возникающих в рамках системных заболеваний или мультиорганных синдромов и системных нарушений

метаболизма. К таким формам, в частности, относятся кардиомиопатии при нейромышечных заболеваниях, болезни Фабри, амилоидозе и РАСопатиях [25, 26, 28, 30, 46]. В соответствии с Европейской классификацией данные формы кардиомиопатий относятся к наследственным. Однако, несмотря на различие в основном принципе классификации, оба подхода подчеркивают значимость наследственной природы заболевания и необходимость выделения генетически обусловленных кардиомиопатий в отдельную группу.

Рестриктивная кардиомиопатия является наиболее редкой среди основных морфологических форм КМП. Развитие РКМП может носить вторичный характер, будучи связано с болезнями накопления, амилоидозом или инфильтративными заболеваниями [9, 37, 47, 287]. Однако наиболее тяжелыми являются идиопатические случаи заболевания, которые часто носят семейный наследственный характер. Тяжесть течения заболевания определяется развитием синдрома сердечной недостаточности и высоким риском внезапной смерти при данной патологии. Значительная часть пациентов с РКМП имеют признаки застойной сердечной недостаточности уже в детском возрасте, и пересадка сердца зачастую является единственным методом лечения таких больных. Учитывая малую доступность и высокую стоимость данного метода лечения в мире и, в частности, в России, изучение причинных факторов, а также факторов, определяющих особенности клинического течения и прогноза РКМП, разработка более детальных алгоритмов диагностики, а также пренатального скрининга в случае семейных форм заболевания, представляется крайне актуальной.

РКМП характеризуется наличием рестриктивного фенотипа по данным ЭхоКГ в сочетании с нормальным или незначительно уменьшенным размером одного или обоих желудочков, нормальной или почти нормальной систолической функцией и нормальной или незначительно увеличенной толщиной стенок левого желудочка. Несмотря на широкую доступность методов инструментальной и лабораторной диагностики, существует ряд трудностей, связанных с постановкой диагноза семейной формы РКМП. Несмотря на то что основными признаками РКМП являются рестриктивный тип кровенаполнения желудочков при

сохраненной на ранних этапах заболевания насосной функции миокарда, в ряде случаев начальные клинические проявления могут ограничиваться желудочковыми нарушениями ритма, синдромом внезапной смерти и нарушением атриовентрикулярной проводимости. В этом случае [42] интерпретация клинических симптомов может быть затруднена. Ситуация усугубляется возможностью неполной пенетрантности заболевания и относительно небольшими для проведения детального генетического исследования размерами семей.

Нередко генетически обусловленные РКМП сочетаются с нейромышечными заболеваниями, при этом кардиальный фенотип может быть ведущим в клинической картине, а поражение периферических мышц субклиническим (десминопатии, ламинопатии). РКМП может являться одним из проявлений болезней накопления и инфильтративных заболеваний, например, болезни Гоше, болезни Фабри, гемохроматоза, болезни Помпе, болезни Неймана–Пика, а также частью наследственного кардиофациального синдрома Нунана или генетически обусловленных форм амилоидоза (транстиретиновый, гелзолиновый) [13, 19]. Дифференциальная диагностика рестриктивного фенотипа сложна и требует проведения большого количества специальных диагностических тестов и процедур, а определение генетической природы заболевания имеет значение для определения тактики лечения, прогноза и развития возможных осложнений. В то же время раннее выявление именно семейных форм заболевания и определение конкретного генетического дефекта являются крайне важными, так как позволят проводить первичную профилактику в отношении осложнений заболевания у носителей патологического генотипа на доклиническом этапе и тем самым снизить частоту развития синдрома внезапной смерти, тромбоэмболии легочной артерии (ЛА) и других осложнений РКМП. Поскольку кардиомиопатии являются после ишемической болезни сердца (ИБС) второй по частоте причиной, лежащей в основе синдрома внезапной смерти, их ранняя диагностика и определение первичного генетического дефекта исключительно важны. Своевременная постановка кардиовертера может предотвратить гибель таких больных, так как

стандартная антиаритмическая терапия в этих случаях не приводит к снижению частоты внезапной смерти.

Изучение генетического спектра кардиомиопатий актуально как с позиции клинической значимости, так и для более детальной расшифровки патогенеза данной тяжелой группы заболеваний. Так, патогенез внутриклеточных молекулярных событий на фоне мутаций в генах белков ядерной мембраны, например ламина, генов цитоскелета, например десмина, и генов сократительных миофиламентов, например тропонина I, могут различаться. В связи с этим различными должны быть и подходы к ведению таких больных и определению прогноза заболевания. Поэтому актуальным представляется изучение молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий на фоне мутаций в различных группах генов.

Поскольку рестриктивная кардиомиопатия является одной из наиболее редких форм кардиомиопатий, а идиопатическая ее форма диагностируется крайне редко, изучение спектра генетических причин данной формы кардиомиопатий до настоящего времени было затруднено. В отличие от гипертрофической и дилатационной кардиомиопатий, для которых к настоящему времени описано более двух десятков причинных генов, в качестве причины развития РКМП до недавнего времени убедительно была показана роль только четырех генов: *TNNI3*, *MYP7*, *ACTC* и *DES*. До недавнего времени в литературе существовали всего лишь отдельные описания клинических случаев РКМП, ассоциированных с мутациями в генах, кодирующих структурные и сократительные белки кардиомиоцитов. Одними из первых были описаны мутации в гене десмина (*DES*) [63, 325, 415]. Этим работам предшествовали несколько наблюдений о частом сочетании миофибриллярных миопатий с аккумуляцией десминовых филаментов с рестриктивным типом поражения миокарда [76, 77, 352, 438, 439]. Однако, поскольку данные клинические описания приходились на «досенгеровскую» эру, когда установление последовательности гена представляло собой значительные технические сложности и не применялось в рутинных исследованиях, долгое время

генетический дефект не был идентифицирован. Вслед за РКМП, ассоциированной с накоплением внутриклеточных десминовых агрегатов, были описаны первые случаи РКМП, ассоциированной с мутациями в гене сердечного тропонина I (*TNNI3*) [141, 215, 281]. Эти работы положили начало череде идентифицированных мутаций в генах, кодирующих белки саркомера, в частности в генах *TNNT2*, *TNNC1*, *MYL3* [78, 197, 273, 313, 320]. Важно отметить, что в ряде описанных работ среди семейных случаев кардиомиопатий наблюдалась большая вариабельность морфологических форм заболевания. В частности, мутация I39N в гене *TNNT2* у членов одной и той же семьи была ассоциирована с развитием ГКМП, ДКМП и РКМП [273]. Для мутаций в генах саркомерных белков, ассоциированных с РКМП, также описаны характерные случаи сочетания с различными врожденными пороками сердца, в частности с дефектами перегородок и синдромом НЛЖ [176, 197, 428, 437]. Первой и долгое время единственной когортой пациентов с охарактеризованной генетической природой заболевания являлась группа из 12 педиатрических пациентов с идиопатической РКМП из исследования, проведенного группой P. Elliotte [197]. В этой работе авторы исследовали возможность наличия причинных мутаций только в саркомерных генах (*MYH7*, *ACTC*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*) в группе из 12 человек методом секвенирования по Сенгеру. Авторами было показано, что у 33% пациентов были идентифицированы мутации в генах, кодирующих белки саркомера: *TNNI3*, *TNNT2* и *ACTC*. При этом данных о распространенности дефектов генов белков цитоскелета и ядерной оболочки, а также об особенностях генетических детерминант рестриктивной кардиомиопатии в разных возрастных группах, в этом исследовании получено не было. Тем не менее выявление мутаций в генах саркомерных белков при РКМП привело к расширению спектра поиска патогенных вариантов среди саркомерных генов, и чуть позже были описаны первые мутации в генах *MYH7* и *MYBPC3*, ассоциированные с развитием РКМП [154, 195].

Описания несаркомерных генов в качестве причины развития РКМП вновь стали появляться в литературе начиная с 2012 года. Среди новых структурных и цитоскелетных генов, ассоциированных с развитием КМП с рестриктивным

фенотипом, был описан ген *BAG3*, ранее известный в связи с развитием миофибриллярных миопатий [214, 217, 236]. Также был описан случай рецессивной мутации в гене *TTN*, который кодирует самый большой белок человека тайтин, выполняющий функции внутрисаркомерного цитоскелета [315]. Отдельные описания клинических случаев РКМП, ассоциированных с мутациями в генах, кодирующих цитоскелетные белки, включали случаи актинин-ассоциированной кардиомиопатии [145], а также РКМП на фоне мутации в гене альфа-кристаллина *CRYAB* [86]. Последний случай является в своем роде уникальным, так как представляет собой первое и пока единственное описание рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией в данном гене. Ранее все случаи кардиомиопатий, связанных с *CRYAB*, представляли собой ДКМП и ГКМП, часто в сочетании с миофибриллярной миопатией и катарактой, также мутации в данном гене были неоднократно описаны в качестве изолированной причины врожденной семейной формы катаракты [185, 254, 353, 412, 435]. С учетом знаний о тесной связи альфа-кристаллина с десмином, а также с другими белками области Z-диска, обнаружение мутаций в этом гене среди случаев РКМП является ожидаемым и закономерным. Появление данных работ вновь привлекло внимание к цитоскелетным белкам и белкам области Z-дисков как к потенциальным модуляторам ремоделирования миокарда и возможным причинным генам, связанным с развитием РКМП. Было показано, что наряду со значительной долей генов, кодирующих саркомерные белки, среди причинных генов при РКМП могут значительное место занимать гены, кодирующие структурные компоненты кардиомиоцитов. Важность таких цитоскелетных белков и белков области Z-дисков в ремоделировании миокарда и обеспечении его адаптации к гемодинамическому стрессу неоднократно была доказана с использованием экспериментальных животных моделей [124, 262, 374]. Так, была продемонстрирована роль компонентов Z-дисков в реализации процесса дилатации и гипертрофии, а также продемонстрирована важность внутриклеточных сигнальных событий, инициированных в механочувствительных областях саркомера [100, 171, 178]. Особое значение цитоскелетные белки и белки области



Z-дисков имеют в реализации механотрансдукции — процесса, с помощью которого кардиомиоциты воспринимают внешние стимулы механической нагрузки и реагируют путем изменения клеточного метаболизма и реализации экспрессионных программ с целью компенсации в ответ на изменившийся гемодинамический стресс [109]. Существует несколько различных внутриклеточных сайтов сигнализации, которые в ответ на гемодинамическую нагрузку и измененную деформацию миофиламентов способны активировать сигнальные каскады и трансформировать механические стимулы в гипертрофический ответ и изменения  $Ca^{2+}$  гомеостаза. К таким сайтам в кардиомиоцитах относятся область десмосом и вставочных дисков, область Z-дисков и ядерная мембрана. Поскольку мутации в генах, связанных с развитием РКМП, часто затрагивают белки, кодирующие именно компоненты перечисленных структур, более детальное и системное изучение спектра мутаций при РКМП даст возможность не только расширить знания о генетическом фоне данной врожденной патологии, но и глубже раскрыть фундаментальные молекулярные механизмы механотрансдукции и адаптации миокарда к гемодинамическому стрессу.

Несмотря на очевидную актуальность широкого изучения генетических причин РКМП, большинство литературных данных на эту тему все еще представлено отдельными клиническими описаниями. Даже расширение методических возможностей, ставшее доступным в последние годы в связи с появлением массового параллельного секвенирования, не привело к появлению большого количества публикаций относительно спектра генетических причин при РКМП. В отличие от ГКМП и ДКМП, при которых массивные генетические исследования на больших когортах пациентов привели к появлению новых представлений о генетическом спектре данной патологии, сходных работ о РКМП долгое время опубликовано не было [161, 258, 326]. До недавнего времени единственной подобной работой оставалась статья 2008 года J. Kaski, выполненная на 12 случаях РКМП у детей с использованием секвенирования по Сенгеру 8 саркомерных генов [197]. Только в 2016 году появилась первая публикация, включающая 32 пациента с РКМП, где идентификация генетических причин

проводилась методом секвенирования нового поколения с исследованием 77 генов, ассоциированных с развитием КМП [139]. В этой работе было показано, что частота выявления патогенных вариантов при РКМП составляет 60%, а при семейных случаях заболевания достигает 79%. Также в работе было показано примерно равное распределение по количеству причинных вариантов между саркомерными (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*) и цитоскелетными (*DES*, *FLNC*, *LMNA*, *TCAP*) генами, количество которых составляло 10 и 9 вариантов соответственно. В этом исследовании впервые была продемонстрирована роль генов *MYBPC3* и *TPM1* в развитии РКМП, а также вновь показано частое сочетание фенотипа РКМП и ГКМП внутри одной семьи при РКМП, ассоциированных с мутациями в саркомерных генах. Авторы впервые показали роль гена *LMNA* в развитии РКМП. Ранее мутации в гене *LMNA* неоднократно выявлялись в связи с развитием ДКМП и нарушением проводимости. Так, показано, что ген *LMNA* наряду с геном *TNN* является одной из самых частых причин развития ДКМП, частота обнаружения его мутаций при этой патологии достигает 5–8% и ассоциирована с высокой вероятностью проведения трансплантации сердца [310, 326, 405]. Ген ламина А/С *LMNA* также был описан в связи с развитием изолированных нарушений проводимости, АКМП и изолированной фибрилляцией предсердий [130, 199, 268, 304, 443]. Однако до публикации в 2016 году работы М. Gallego-Delgado и соавторов в литературе не существовало сообщений о возможности развития РКМП-фенотипа в связи с мутациями в гене *LMNA* [139]. Таким образом, в данной работе впервые была продемонстрирована возможность ассоциации РКМП с мутациями в генах, кодирующих и цитоскелетные белки ядерной оболочки.

К ограничениям описанной выше работы следует отнести отсутствие детального анализа корреляции генотипа и фенотипа, а также отсутствие классификации выявленных вариантов в соответствии с рекомендациями Американского общества медицинской генетики [342]. Данная классификация в настоящий момент является определяющим документом при описании возможной патогенной роли выявленных генетических вариантов и для доказательства их

причинности. В связи с этим крайне актуальным представляется дальнейшее проведение исследований по расшифровке генетического спектра причин и молекулярного патогенеза РКМП.

## 1.2. Кардиомиопатии и нейромышечные заболевания

Генетические исследования нейромышечных заболеваний (НМЗ) внесли существенный вклад в раскрытие генетических аспектов врожденной патологии сердечно-сосудистой системы, такой как кардиомиопатии и наследственные аритмические синдромы [21]. Прежде всего необходимо отметить, что первая мутация, описанная у пациента с ДКМП, была мутацией в гене *DYS*, который за несколько лет до этого стал известен как причинный ген развития мышечной дистрофии Дюшенна [5, 177]. Поражение миокарда в виде ДКМП при этом X-связанном варианте мышечной дистрофии инициировало поиск мутаций в гене дистрофина у пациентов мужского пола с изолированными вариантами ДКМП даже без мышечного фенотипа [129]. С тех пор было описано более 80 генов, ассоциированных с различными типами кардиомиопатий, около 25% из них также вызывают нейромышечные заболевания в качестве аллельных форм. Связь между возникновением сердечно-сосудистых и нейромышечных проявлений обусловлена одновременной экспрессией гена как в скелетной, так и сердечной мышце, а иногда и в клетках гладкой мускулатуры. Это особенно касается структурных белков миоцитов, таких как дистрофин (*DYS*) и саркогликаны, десмин (*DES*) и тайтин (*TTN*). Исходный список таких давно известных генов, как *DYS*, *LMNA*, *DES*, *CRYAB*, *TAZ* и *CRYB* в последнее время был значительно расширен благодаря внедрению технологии массового параллельного секвенирования, и в настоящее время включает также гены *CAV3*, *BAG3*, *FLNC*, *TTH*, *ZASP*, *FKTN*, *FKRP*, *FHL1*, *SYNE1*, *MYPN*, *CSRP*, *T-CAP*, *MYH7*, *MYBPC3* и ряд других [83, 97, 118, 210, 239, 259, 289, 292, 297, 348, 441]. Некоторые из этих генов, кодирующих структурные белки, например *LMNA*, *LDB3* и *MYOZ*, также имеют регуляторную функцию, участвуя в модулировании экспрессии генов и

механотрансдукции [110, 131, 135, 444]. Известно, что результирующий фенотип вследствие патогенных вариантов в данных генах может быть преимущественно либо мышечным, либо сердечным, либо и тем, и другим. Однако точная корреляция генотипа и фенотипа не всегда прослеживается. Иногда определенная мутация может привести к развитию всех фенотипических форм заболевания, часто даже в одной и той же семье, что, вероятно, может быть обусловлено ген-генными взаимодействиями и влиянием модифицирующих генов, факторов окружающей среды или образа жизни. В связи с этим пациент с предполагаемой генетически обусловленной кардиомиопатией всегда должен быть осмотрен на наличие субклинических нейромышечных симптомов, а каскадное обследование членов семьи должно включать целенаправленное неврологическое обследование и ряд биохимических и функциональных мышечных тестов. С другой стороны, обследование сердечно-сосудистой системы должно быть обязательной частью клинического обследования пациента и его родственников с нейромышечным расстройством. Наиболее частыми причинами развития кардиомиопатий с нейромышечной симптоматикой являются мутации в генах ламина, десмина и дистрофина.

Ламинопатии представляют собой группу заболеваний, вызванных мутациями в гене *LMNA*, кодирующего ламин А/С — основной компонент ядерной ламины. Ламинопатии охватывают широкий спектр расстройств с преимущественным поражением нейромышечной системы, часто с вовлечением миокарда и развитием фатальных нарушений сердечного ритма. Помимо этого ламинопатии могут проявляться в виде изолированной кардиомиопатии, липодистрофии, периферической нейропатии, а также прогерии Хатчинсона–Гилфорда.

Основными формами мышечной дистрофии, ассоциированной с мутациями в *LMNA*, являются аутосомно-доминантная и аутосомно-рецессивная мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса (EDMD2 и EDMD3) и конечно-поясная мышечная дистрофия 1В (LGMD1В). Миодистрофия Эмери–Дрейфуса характеризуется клинически ранними контрактурами и медленно прогрессирующей дистрофией и

атрофией проксимальных скелетных мышц. При обеих формах этой ламинопатии наблюдается поражение миокарда, как правило, в форме ДКМП или наджелудочковых и желудочковых нарушений ритма вплоть до развития АКМП с довольно поздним дебютом, примерно в 30–40 лет. Однако недавно было описано несколько случаев РКМП на фоне мутаций в гене ламина [62, 275]. Наиболее типичной особенностью кардиомиопатий, связанных с ламинами A/C, является нарушение проводимости и ритма. Так, при метаанализе 299 пациентов с мутациями в *LMNA*, у 18% пациентов в возрасте до 10 лет имелись признаки замедленного атриовентрикулярного проведения, а среди пациентов старше 30 лет более 90% имели признаки нарушения проводимости, которые в 44% требовали постановки кардиостимулятора [402]. Важной для понимания фенотипического проявления кардиомиопатий, связанных с мутациями в гене *LMNA*, является работа M. Palled, в которой впервые показана возможность развития РКМП вследствие ламинопатии [306]. Суммируя вышесказанное, мутации в гене *LMNA* являются одними из наиболее частых причин КМП, ассоциированных с поражением нейромышечной системы, приводя к формированию дилатационной, аритмогенной или рестриктивной кардиомиопатии.

Десмин-ассоциированная кардиомиопатия — еще одна первичная генетическая кардиомиопатия, которая часто сочетается с нейромышечным фенотипом. Десмин-ассоциированные миопатии и кардиомиопатии связаны с мутациями в гене *DES* или других генах, влияющих на структуру или функцию промежуточных филаментов. Десмин является основным промежуточным филаментом всех типов мышечных клеток скелетной, сердечной и гладкой мускулатуры в постнатальном периоде, обеспечивающим структурно-механические цитоскелетные функции и выступающим в качестве якоря для нескольких клеточных органелл [90, 172]. Филаменты десмина соединяют миофибриллы с ядерными и наружными клеточными мембранами, являясь частью десмосом и структуры костамера и, таким образом, обеспечивают механическую целостность и передачу силы в мышечные клетки.

В 1978 году Fardeau описал случай семейной миопатии с накоплением десмин-положительных гранулофиламентных агрегатов в мышечных клетках и связал эту патологию с десмином, что позже было подтверждено и другими авторами [122, 127]. В течение следующих 20 лет появилось большое количество публикаций о случаях наследственных миопатий и кардиомиопатий с внутриклеточным накоплением десмина. В 1998 году Goldfarb впервые продемонстрировал, что эти расстройства могут быть вызваны мутациями в гене *DES* [148]. К настоящему моменту описано более 50 мутаций в этом гене, и их число продолжает увеличиваться. Большинство описанных мутаций локализованы в последовательности, кодирующей С-концевую часть стержневого домена десмина, в экзонах 5 и 6. Из-за высокой экспрессии десмина во всех типах мышечных клеток у большинства пациентов с мутацией в этом гене обнаруживается нейромышечная симптоматика в сочетании с различными вариантами кардиомиопатий. Только у 22% пациентов выявляются изолированные проявления со стороны сердечно-сосудистой или мышечной системы, а в остальных случаях тщательное обследование пациентов приводит к выявлению сочетанной симптоматики [404]. Примерно в половине случаев кардиомиопатия имеет фенотип ДКМП, однако может проявляться и РКМП или ГКМП. Тот факт, что при десминовой кардиомиопатии средний возраст постановки диагноза ДКМП (46 лет) значительно выше, чем РКМП (33 года) или ГКМП (28 лет), наряду с нашими собственными наблюдениями свидетельствует о том, что гипертрофия миокарда или рестриктивный тип наполнения могут представлять собой более ранние стадии заболевания, которое потом трансформируется в ДКМП и тяжелую систолическую дисфункцию [404]. Дебют заболевания обычно происходит в возрасте от 20 до 40 лет при аутосомно-доминантном типе наследования, однако в редких случаях аутосомно-рецессивного типа наследования симптомы появляются в раннем детстве, а болезнь прогрессирует быстрее [319, 389, 404]. Симптомы миопатии могут включать дистальную и проксимальную мышечную слабость и атрофию [362]. Поскольку клиническая картина миопатии может развиваться вслед за проявлениями кардиомиопатии, все пациенты с подозрением на десминовую

кардиомиопатию должны быть тщательно обследованы неврологом с применением и электромиографии. Для десминопатий характерно незначительное повышение уровня общей креатинфосфокиназы (КФК), в большинстве случаев не превышающее 2–4-кратного уровня нормальных значений. Однако даже в случаях изолированного мышечного фенотипа повышение КФК может отсутствовать, поэтому отсутствие биохимических маркеров скелетно-мышечного поражения не исключает наличия у пациентов десминовой миопатии.

Одними из наиболее типичных признаков десминовой кардиомиопатии являются нарушения проводимости и желудочковые аритмии, сходные с наблюдаемыми при мутациях в гене ламина А/С. Как и в случае ламинопатий, они могут предшествовать развитию дисфункции левого желудочка, но случаи изолированного расстройства проводимости не являются частыми, и в конечном итоге обычно развивается дилатационное ремоделирование миокарда. Наиболее частыми нарушениями ритма при десминовых кардиомиопатиях являются атриовентрикулярные блокады наряду с блокадой ножек пучка Гиса и аномалиями синоатриальной проводимости. Десмин-связанная кардиомиопатия может проявляться преимущественно в виде ДКМП с желудочковыми нарушениями ритма, в связи с чем, несмотря на низкую частоту мутаций в гене *DES*, случаи АКМП также могут рассматриваться как возможное проявление десминопатий [208, 305, 308, 406]. Несмотря на высокую частоту имплантации кардиостимуляторов у пациентов с десминовой кардиомиопатией, они не защищены от синдрома внезапной сердечной смерти, в связи с чем эти пациенты являются кандидатами для установки имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора (ИКД). Рестриктивная кардиомиопатия является одним из проявлений десминопатий. При анализе случаев дистальной миопатии с внутриклеточной аккумуляцией десминовых филаментов рестриктивный тип кардиомиопатии обнаруживается наиболее часто. При этом диастолическая сердечная недостаточность часто выходит на первый план в клинической картине заболевания и требует проведения трансплантации сердца.

В случаях десминовой миопатии и кардиомиопатии может быть прослежена некоторая корреляция генотипа и фенотипа. Например, большинство изолированных нейромышечных фенотипов были описаны у пациентов с мутациями, затрагивающими 2В-часть стержневого домена, тогда как большинство изолированных кардиомиопатий обусловлено мутациями, нарушающими структуру головного или хвостового домена [389, 404]. Однако, поскольку это правило имеет множество исключений и ген относительно невелик, в каждом случае с целью генетической диагностики необходимо проводить полный скрининг всего гена. Важно отметить, что у части пациентов могут отмечаться признаки вовлечения гладкой мускулатуры в виде проблем с глотанием или хронической диспепсии и диареи [64]. Их идентификация также может быть информативной для определения тактики генетического тестирования.

Еще одним геном, мутации в котором приводят к развитию кардиомиопатий с аккумуляцией десминовых филаментов в сочетании с нейромышечной симптоматикой, является *CRYB*. Альфа-В-кристаллин представляет собой белок теплового шока с функцией шаперона, участвующий во многих клеточных процессах. Патогенная мутация в *CRYB* была впервые описана при миофибриллярной миопатии с внутриклеточными десминовыми агрегатами, и, поскольку альфа-В-кристаллин участвует в стабилизации десминовых филаментов, нарушение функций альфа-В-кристаллина приводит к внутриклеточному накоплению десмина. Кардиомиопатии, ассоциированные с мутациями в *CRYB*, могут иметь фенотип ДКМП, ГКМП или РКМП, а также сочетаться с катарактой [412]. В настоящее время представляется, что частота изолированных альфа-В-кристаллин-ассоциированных кардиомиопатий является очень низкой.

Одним из генов, связь которого была недавно продемонстрирована с развитием как нейромышечных заболеваний, так и нескольких типов кардиомиопатий, является ген *FLNC* [73, 85, 151, 302, 339, 401]. *FLNC* кодирует филамин С, который в кардиомиоцитах и в клетках скелетных мышц является основным актин-связывающим белком. Помимо структурной роли и участия в организации Z-линии, филамин С играет важную роль в системе деградации белка



и контроле процесса аутофагии [209, 235, 349]. В последнее десятилетие мутации в *FLNC* были описаны в связи с несколькими различными врожденными нейромышечными заболеваниями, такими как миофибриллярная миопатия и дистальная миопатия, а в последние годы мутации в гене *FLNC* были описаны как частая причина развития кардиомиопатии [73, 85, 151, 302, 339, 401]. Несмотря на то что мутации в гене *FLNC* могут являться нередкой причиной развития ГКМП, ДКМП и АКМП, мало что известно об ассоциации мутаций в *FLNC* с РКМП [85, 399]. Важно отметить, что среди всех описанных случаев кардиомиопатий, вызванных мутациями в *FLNC*, существует только несколько случаев с комбинированным фенотипом, включающим поражение как сердечно-сосудистой, так и мышечной систем [151, 302].

Недавно был описан ряд новых генов, ассоциированных с развитием нейромышечной патологии, в качестве причины развития различных типов кардиомиопатий. Среди них можно отметить такие гены, как *Cypher/ZASP (LDB3)*, ассоциированный с ДКМП и синдромом НЛЖ, *BAG3*, ассоциированный с РКМП, *небулет (NEBL)*, ассоциированный с ДКМП, и *телетонин (TCAP)*, ассоциированный с ДКМП и ГКМП [170, 327, 408]. Однако ни в одном из упомянутых исследований не представлена детальная клиническая картина состояния нейромышечной системы пациентов и не ясно, является ли кардиомиопатия единственным изолированным фенотипом. Расширенное проведение генотипирования и накопление информации относительно корреляции генотипа и фенотипа позволят уточнить роль данных генов в развитии кардиомиопатий в сочетании с нейромышечным фенотипом.

### **1.3. Особенности течения сердечной недостаточности и прогноз для пациентов с РКМП**

Тяжесть течения РКМП и плохой прогноз для пациентов с данной патологией, ограниченная эффективность лекарственной терапии и отсутствие этиологических подходов к лечению диктуют необходимость применения в данной группе пациентов высокотехнологичных методов лечения, таких как имплантация ИКД и проведение трансплантации сердца. Вследствие особенностей ремоделирования миокарда при РКМП и преобладания диастолической дисфункции на фоне малых размеров левого желудочка применение имплантируемых левожелудочковых устройств (ИЛЖУ) в группе пациентов с РКМП малоэффективно [12, 50, 114, 156, 173, 238, 311]. Первый анализ потенциальной возможности применения ИЛЖУ у пациентов с РКМП был проведен в 2011 году Topilsky и соавторами [395]. В данной работе группа пациентов с РКМП составляла всего 4 человека наряду с группой из 4 пациентов с ГКМП. Сравнительный анализ проводился с группой ДКМП, включающей в себя 75 пациентов с ДКМП и дилатацией миокарда ишемического генеза. Главным результатом данного исследования была демонстрация потенциальной возможности использовать ИЛЖУ в группе РКМП и ГКМП и сравнимость результатов посттрансплантационной выживаемости, а также количества осложнений в группах ДКМП, РКМП и ГКМП.

В последующем было выполнено еще несколько работ относительно эффективности применения ИЛЖУ у пациентов с РКМП. Так, в частности, в работе A. Grupper и соавторов, выполненной на базе клинки Mayo в 2015 году, был проведен анализ 28 случаев имплантации ИЛЖУ пациентам с РКМП различной этиологии и было показано, что годовая бестрансплантационная выживаемость пациентов с РКМП и имплантированным устройством составляла 64% [156]. Наилучший прогноз в данном исследовании наблюдался у пациентов с большими размерами левого желудочка, а наихудший у пациентов с конечно-диастолическим размером ЛЖ (КДР) менее 46 мм. Однако в данную работу не были включены

пациенты с идиопатическими генетически обусловленными формами изолированной РКМП, и в большинстве случаев основными причинами рестриктивного фенотипа являлись AL-амилоидоз и ГКМП с рестриктивным фенотипом, также постлучевые формы РКМП, саркоидоз и болезнь Фабри. Наиболее крупным исследованием, посвященным эффективности применения ИЛЖУ у пациентов с РКМП, к настоящему времени является исследование S. Patel, 2017, в которое были включены 104 пациента: 15,3% с амилоидозом, 16,3% с саркоидозом, 15,3% с постлучевыми формами РКМП и 29,8% с идиопатическими формами РКМП [311]. Оставшиеся 23% пациентов с РКМП имели смешанную этиологию. Большинство пациентов имели смешанный фенотип, несмотря на рестриктивный тип кровенаполнения, что выражалось в наличии дилатации миокарда ЛЖ и дилатации ЛП. В данном исследовании было показано, что годовая бестрансплантационная выживаемость пациентов с РКМП и ГКМП сопоставимы с таковой в группе ДКМП. Однако при сравнении группы пациентов с изолированным рестриктивным фенотипом ( $KDP < 5$  см) и группы со смешанным фенотипом ( $KDP \geq 5$  см) было показано, что в первом случае выживаемость в течение первого года составляла 35%, а во втором — 88%, в обоих случаях, не завися от фракции выброса левого желудочка. Таким образом, основным лимитирующим фактором, определяющим возможность применения ИЛЖУ у пациентов с РКМП, является размер ЛЖ. Поскольку в случае большинства идиопатических форм РКМП дилатация миокарда ЛЖ развивается редко, в отличие от случаев РКМП на фоне саркоидоза, амилоидоза сердца и постлучевых поражений, применение ИЛЖУ в группе идиопатической РКМП имеет существенные ограничения.

В связи с невозможностью широкого применения ИЛЖУ и отсутствием гемодинамических и электрофизиологических предпосылок к имплантации ресинхронизирующих устройств, единственным высокотехнологичным методом лечения пациентов с идиопатической РКМП является трансплантация сердца [44]. По этой причине определение оптимальных сроков проведения трансплантации в

группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), обусловленной идиопатической РКМП, является крайне актуальной задачей.

В настоящее время существует несколько шкал для оценки прогноза течения сердечной недостаточности. В большинстве из них ключевыми показателями являются годовая и трехлетняя выживаемость пациентов. Определение высокого риска неблагоприятного исхода пациентов с ХСН в течение последующего года может служить показанием к активному включению пациента в лист ожидания ТС. Сложность применения данных шкал в отношении пациентов с ХСН, обусловленной РКМП, заключается в том, что большинство имеющихся шкал разработаны и валидизированы для группы пациентов с ХСН с низкой фракцией выброса (СН-нФВ), в то время как группа РКМП представлена в основном пациентами с ХСН с сохранной фракцией выброса (СН-сФВ) и промежуточной фракцией выброса (СН-пФВ). Наиболее известными для оценки выживаемости пациентов с ХСН в настоящее время являются следующие шкалы: Сиэттлская шкала риска SHFM [240], шкала HFSS [146], шкалы MAGGIC [321], МЕСКИ [56], 3С-НФ [409] и MUSIC [409]. Сравнительная характеристика данных шкал приведена ниже в Таблице 1.

Шкала HFSS была предложена в 1997 году — первой среди перечисленных [52]. Изначально данная шкала включала в себя более 20 инвазивных и неинвазивных параметров и предназначалась для оценки прогноза пациентов как с СН-сФВ, так и с СН-нФВ. С момента создания шкала претерпела ряд модификаций и в настоящее время включает в себя 7 параметров, среди которых пиковое потребление  $O_2$  в процессе проведения кардиореспираторного теста (КРТ). Существенным преимуществом данной шкалы является возможность ее применения для группы пациентов с сохранной фракцией выброса.

Таблица 1 — Сравнительная характеристика шкал оценки прогноза ХСН

	HFSS	SHFM	MECKI	MAGGIC	3C-HF	MUSIC
Возраст	-	+	-	+	+	-
Пол	-	+	-	+	-	-
СД <sup>1</sup>	-	-	-	+	+	-
ХОБЛ	-	-	-	+		-
Артериальная гипертензия	-	-	-	-	+	-
Перенесенный сосудистый эпизод вследствие атеросклероза <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	+
Значимая патология клапанного аппарата	-	-	-	-	+	-
Диагноз ХСН поставлен в течение последних 18 мес.	-	-	-	+	-	-
Курение	-	-	-	+	-	-
Класс ХСН (NYHA) <sup>3</sup>	-	+	-	+	+	-
Бета-блокаторы	-	+	-	+	+	-
ИАПФ/АРА	-	+	-	+	+	-
Петлевые и тиазидные диуретики	-	+	-	-	-	-
Верошпирон	-	+	-	-	-	-
Аллопуринол	-	+	-	-	-	-
Статины	-	+	-	-	-	-
Этиология ХСН (ишемическая/неишемическая)	+	+	-	-	-	-
Имплантируемые устройства <sup>4</sup>	-	+	-	-	-	-
PEAK VO <sub>2</sub>	+	-	+	-	-	-
VE/VCO <sub>2</sub>	-	-	+	-	-	-
ИМТ <sup>5</sup>	-	+	-	+	-	-
Систол. АД <sup>6</sup>	+	+	-	+	-	-
ЧСС	+	-	-	-	-	-
Сывороточный креатинин <sup>7</sup>	-	-	+	+	+	-
Сывороточный натрий <sup>8</sup>	+	+	+	-	-	-
Сывороточный калий	-		-	-	-	-
Сывороточная мочевая кислота	-	+	-	-	-	-
Холестерин	-	+	-	-	-	-
Лимфоциты	-	+	-	-	-	-
Гемоглобин/наличие анемии <sup>9</sup>	-	+	+	-	+	
NT-proBNP <sup>10</sup>	-	-		-		+
Положительный тропонин-тест	-	-	-	-	-	+
Фракция выброса ЛЖ <sup>11</sup>	+	+	+	+	+	+
Размеры ЛП <sup>12</sup>	-	-	-	-	-	+

	HFSS	SHFM	MECKI	MAGGIC	3C-HF	MUSIC
Фибрилляция предсердий	-	-	-	-	+	+
ПБЛНПГ или нарушение внутрижелудочковой проводимости	+	-	-	-	-	+
Неустойчивая ЖТ или частые ЖЭ	-	-	-	-	-	+
СКФ <sup>13</sup>	-	-	-	-	-	+
Возможность использования для пациентов с СН-сФВ	+	-	-	+	+	+

1 — для шкалы 3C-HF учитывается только осложненный СД (наличие ретинопатии, нейропатии, нефропатии, ИБС или периферической ангиопатии нижних конечностей); 2 — инсульт, инфаркт миокарда, ишемия нижних конечностей; 3 — для шкалы 3C-HF учитываются только III–IV классы; 4 — двухкамерный стимулятор, ИКД или стимулятор/ИКД; 5 — для шкалы MAGGIC учитывается вес; 6 — для шкалы HFSS учитывается среднее АД; 7 — для шкалы 3C-HF учитывается сывороточный креатинин более 2 мг/дл; 8 — для шкалы MUSIC уровень натрия  $\leq 138$  мМ/л; 9 — для шкалы 3C-HF учитывается анемия при уровне гемоглобина  $< 110$  г/л; 10 — для шкалы MUSIC уровень NT-proBNP  $\geq 1000$  нг/л; 11 — для шкалы 3C-HF учитывается только ФВ  $\leq 20\%$ , а для шкалы MUSIC только ФВ  $\leq 35\%$ ; 12 — для шкалы MUSIC индекс ЛП  $> 26$  мм/м<sup>2</sup>; 13 — СКФ  $< 60$  мл/мин/1,73 м<sup>2</sup>.

В 2006 году была разработана Сиэттлская шкала оценки прогноза при ХСН [240]. Данная шкала (SHFM) до сих пор является одной из наиболее информативных и широко используемых шкал. Несомненным ее преимуществом является отсутствие необходимости проведения КРТ, что делает данную шкалу применимой у широкой категории амбулаторных пациентов. Ограничением данной шкалы является возможность ее использования исключительно у пациентов с СН-нФВ, поскольку она была разработана и валидизирована именно на данной группе пациентов. Опубликовано несколько исследований, сравнивающих информативность и точность двух перечисленных шкал. В большинстве из них показано, что применение обеих шкал в когортах пациентов со сниженной фракцией дает сопоставимые результаты [56, 134, 146].

Недавно группой итальянских авторов в рамках консорциума, включающего 13 лечебных учреждений и 2715 пациентов, была разработана шкала MECKI для оценки прогноза пациентов с СН-нФВ [55]. Данная шкала включает в себя 6 параметров оценки, среди которых данные кардиопульмонального теста и показатели функции почек — скорость клубочковой фильтрации (СКФ),

рассчитанная по формуле MDRD. Сравнение информативности нескольких шкал на популяции пациентов с СН-нФВ показало, что информативность шкал HFSS, SHFM и MECKI во многом сопоставима, с небольшим преимуществом шкалы MECKI в отношении таких конечных точек, как смерть от сердечно-сосудистых причин, срочная трансплантация сердца и имплантация ИКД [56]. Превосходство данной шкалы по информативности было особенно выражено в отношении прогноза пациентов с III–IV функциональным классом сердечной недостаточности. В целом валидность и информативность всех трех шкал — HFSS, SHFM и MECKI — в отношении пациентов с СН-нФВ сопоставима и в ряде случаев их сочетанное использование повышает предсказательную ценность в отношении прогноза для пациентов [146, 186].

Возможностью оценки прогноза в группе пациентов с ХСН и сохранной фракцией выброса обладают шкалы MAGGIC [321], 3С-HF [366] и шкала MUSIC [409]. Первой из них в 2009 году была предложена шкала MUSIC, разработанная на когорте из 992 пациентов с различными формами ХСН. Отличительной особенностью данной шкалы является возможность оценки как общей смертности, так и отдельно смертности от совокупности сердечно-сосудистых причин, внезапной смерти и смерти по причине систолической дисфункции. В дополнение, среди факторов, учитываемых в данной шкале риска, есть такие показатели, как фибрилляция предсердий и размеры левого предсердия, которые отсутствуют в большинстве из приведенных выше шкал, а также неустойчивые пароксизмы желудочковой тахикардии и частая желудочковая экстрасистолия, что позволяет производить отдельную оценку риска внезапной сердечной смерти. Данная шкала позволяет рассчитать общее количество баллов для каждого пациента и стратифицировать его в группу высокого или низкого риска, не обладая, таким образом, предсказательной способностью относительно достижения конечных точек в течение 1 или 3 лет. В связи с этим анализ ее информативности относительно других шкал затруднен, и, возможно, по этой причине ее применение крайне ограничено. В то же время недавно авторами данной шкалы было показано, что добавление таких ЭКГ-параметров, как индекс усредненной альтернации, наклон

турбулентности и морфология волны T в данную шкалу, существенно повышает ее предиктивную ценность, особенно в отношении пациентов с СН-нФВ и риска достижения ими конечной точки по причине систолической дисфункции [332].

Шкала 3С-НФ была создана в 2013 году преимущественно для оценки вклада коморбидной патологии в прогноз ХСН. Особенностью данной шкалы является ее создание в основном на основе проспективных наблюдений, а также возможность оценки пациентов с СН-сФВ. Еще одной отличительной особенностью данной шкалы является, как и в шкале MUSIC, наличие такого показателя, как фибрилляция предсердий, однако без учета размеров левого предсердия. Важно отметить, что при использовании аддитивной модели данной шкалы учитывается не абсолютный показатель фракции выброса ЛЖ, а наличие ее снижения менее 20%. Более углубленный анализ, проведенный позже на той же когорте пациентов в 2014–2016 гг., показал, что дополнительными факторами риска, ухудшающими прогноз в группе пациентов с низким риском, являются возраст, нарушение функции почек и мужской пол, а факторами, определяющими благоприятный прогноз в группе пациентов высокого риска, — сохраненная функция почек и более высокий индекс массы тела [101, 350].

Наиболее широко применяемой шкалой, созданной в 2013 году на основе анализа данных наибольшего количества пациентов (39 372 человека) и применяемой в случае СН-сФВ наряду с СН-нФВ, является шкала MAGGIC, разработанная консорциумом «Meta-Analysis Global Group in Chronic Heart Failure» [321]. Данная шкала включает в себя 14 параметров, легко определяемых в рутинной клинической практике, и не содержит показателей, получаемых в результате проведения КРТ. Единственным биохимическим параметром, учитываемым в данной шкале, является сывороточный креатинин, что также делает ее легко доступной для широкого применения и валидации.

Одним из наиболее часто учитываемых биохимических параметров при оценке тяжести ХСН является уровень NT-proBNP (N-концевой участок мозгового натриуретического пептида), в связи с чем возможность дополнения основных перечисленных выше шкал этим показателем для повышения их информативности



оценивалась в нескольких работах. Так, было показано, что дополнительный учет уровня NT-proBNP в шкалах SHFM и 3С-НФ приводит к повышению их информативности и увеличению показателя площади под кривой [65]. Сходные данные были получены и для шкалы MAGGIC [358]. Однако отсутствие рутинного измерения NT-proBNP у большинства амбулаторных пациентов и значительной части госпитализированных пациентов с ХСН в настоящее время не позволяет использовать данный показатель для расчета риска по данным шкалам в повседневной клинической практике.

Применение всех перечисленных шкал было валидизировано в основном на популяциях пациентов с ХСН ишемического генеза и в большей степени со сниженной фракцией выброса. Это обусловлено тем фактором, что их применение направлено на выделение когорты пациентов, нуждающихся в применении высокотехнологичной медицинской помощи — трансплантации сердца и имплантации левожелудочковых устройств. Поскольку данные виды помощи редко применяются у пациентов с СН-сФВ ишемического генеза, их валидизация в данной группе менее освещена в литературе. Данных об информативности данных шкал и возможности их использования в отношении группы пациентов с СН-сФВ не ишемического генеза в доступной нами литературе не найдено. В связи с чем анализ возможности применения всех перечисленных выше шкал у пациентов с РКМП и ХСН является крайне актуальным с учетом ограниченных возможностей консервативной терапии и отсутствием этиотропных подходов в данной группе пациентов, невозможностью широкого применения ИЛЖУ и высокой потребностью в проведении трансплантации сердца.

#### **1.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене десмина (*DES*)**

Десмин представляет собой цитоскелетный белок с молекулярной массой 53 кДа и является основным представителем промежуточных филаментов (ПФ) в мышечных клетках. ПФ являются компонентом цитоскелета всех эукариотических

клеток и представляют собой один из трех классов цитоскелетных белков. Промежуточными они называются в соответствии со своим диаметром (10 нм), который является промежуточным между волокнами тубулина (20 нм) и тонких актиновых филаментов (8 нм). ПФ экспрессируются во всех типах клеток организма и составляют приблизительно 1% от клеточной массы. Основная функция всех типов ПФ — поддержание структурной целостности клетки [95]. Они образуют внутриклеточную сеть, соединяющую различные органеллы с ядерной и клеточной мембранами, участвуют в формировании межклеточных контактов и позиционировании мембранных органелл [137, 234].

В раннем эмбриональном периоде основными ПФ мышечных клеток являются нестин и виментин. Однако уровень их экспрессии со временем уменьшается, и после рождения они не определяются в дифференцированных миоцитах [363]. Экспрессия нестина и виментина во взрослых мышечных клетках может являться маркером патологического процесса или регенерации мышц. Примером этого является мышечная дистрофия Дюшена, где дистрофический процесс приводит к активной пролиферации сателлитных клеток и появлению незрелых регенерирующих волокон. Экспрессия десмина начинается на ранних эмбриональных стадиях. В миокарде человека он может быть обнаружен уже на 8-й неделе беременности [203]. Его экспрессия в мышечных клетках возрастает во время эмбриогенеза, и к моменту рождения десмин является основным ПФ здоровых зрелых мышечных клеток и кардиомиоцитов в организме человека.

В 1996 году последовательность гена *DES* была расшифрована, а позже была доказана связь мутаций в гене десмина с дистальной миопатией и кардиомиопатией. Ген десмина состоит из 9 экзонов и является высоко консервативным среди позвоночных. Десмин экспрессируется в поперечно-полосатых и гладких мышцах, а также в миокарде. Инициирование сборки десминовых филаментов происходит вокруг ядерной мембраны посредством взаимодействия с ламиной через С-концевой хвостовой домен десмина. Взаимодействие же с наружной клеточной мембраной осуществляется через N-терминальный головной домен в области десмосом [60]. В области десмосомы

филаменты десмина расширяются и взаимодействуют с десмосомными белками, обеспечивая плотный контакт с десмосомами и наружной клеточной мембраной.

Филаменты десмина связываются с миофибриллами в области Z-дисков, что объясняет наиболее интенсивное окрашивание именно этих областей антителами против десмина и приводит к типичной картине поперечно-полосатой исчерченности. Несмотря на хорошо изученную структуру десмина и его внутриклеточную локализацию, роль этого белка в нормальном развитии и функционировании мышечной клетки до конца не ясна, и данные о роли десмина в саркомерной организации противоречивы. Было показано, что десмин-нокаутные мыши являются жизнеспособными и фертильными [248]. По мнению нескольких авторов, саркомерная организация и сбор миофибрилл в эмбриональном периоде этих животных не нарушаются [248, 390]. Это косвенно свидетельствует о том, что десмин не является существенным для миофибриллогенеза и пространственной организации саркомера. Однако в постнатальном периоде у мышей, нокаутных по гену десмина, обнаруживаются значительные изменения структуры мышечных клеток и кардиомиоцитов. Ультраструктурные дефекты включают дезорганизацию миофибрилл и изменение их латерального выравнивания, аномальную структуру митохондрий и форму ядра клетки [91]. Таким образом, десмин является важным для стабилизации миофибрилл после завершения формирования саркомера. В культурах эмбриональных куриных кардиомиоцитов применение антидесминовых антител приводило к изменению распределения  $\alpha$ -актинина, тайтина, миозин-связывающего белка C и актина [418]. Поскольку  $\alpha$ -актинин и тайтин являются компонентами структуры Z-диска, их перераспределение и невозможность надлежащего включения в структуру саркомера, по всей вероятности, отражают нарушение взаимодействия с десминовыми филаментами. Одной из основных функций десмина в поперечно-полосатых мышечных клетках является поддержание параллельного выравнивания миофибрилл [123]. Сокращение мышечной клетки является результатом многих отдельных сокращений миофибрилл. Таким образом, их одновременная деформация с равным укорочением саркомеров является обязательным условием эффективной генерации

силы в мышечном волокне. Отдельное укорочение разнонаправленных миофибрилл различной длины приведет к уменьшению силы сжатия. Десминовые волокна, связанные с Z-линиями, обеспечивают равную длину саркомеров и обеспечивают увеличение силы сжатия в мышечных клетках [174].

Будучи структурной основой Z-дисков, десмин является одним из ключевых компонентов в процессе механотрансдукции, участвуя в сохранении целостности клетки и обеспечивая ее устойчивость к механическому стрессу в процессе сокращения/растяжения. Это может иметь большое значение в развитии гипертрофии кардиомиоцитов в ответ на нагрузку давлением и объемом. Так, ряд авторов показали способность десмина влиять на внутриядерные события и участвовать в процессе регуляции экспрессии генов. Другой важной функцией десмина является взаимодействие с различными клеточными органеллами и их позиционирование внутри клетки. Это имеет особое значение для структуры и функции митохондрий, как было показано у десмин-нокаутных мышей [89, 187, 354].

Известно, что в основе развития десминовых миопатий и кардиомиопатий чаще всего лежит нарушение процесса полимеризации десминовых филаментов вследствие мутаций в гене десмина. В результате доминантно-негативного эффекта большинства описанных мутаций происходит формирование внутриклеточных десминовых агрегатов и нарушение внутриклеточной архитектуры мышечной клетки. Однако в ряде случаев даже без грубого нарушения архитектуры десминовых филаментов, а также на ранних стадиях развития патологии до формирования десминовых агрегатов выявляются нарушения структуры и функции митохондрий. Механизм нарушения функционирования митохондриальной мембраны вследствие мутаций в гене *DES* на сегодняшний момент до конца не изучен, однако показано, что он может являться одним из ключевых триггеров в развитии заболевания. На сегодняшний момент все исследования, касающиеся роли десмина в обеспечении структуры и функции митохондрий, выполнены с использованием нокаутных и трансгенных моделей животных. При этом показано, что в скелетно-мышечных клетках и

кардиомиоцитах механизм нарушения структуры и функции митохондрий имеет схожий характер. Эти исследования позволили накопить большой объем научной информации, однако они обладают рядом недостатков, связанных с использованием нокаутных и трансгенных мышечных моделей, не отражающих естественных физиологических клеточных процессов, происходящих в мышечных клетках при мутациях в гене *DES*. В связи со сложной доступностью исследовательского материала, такого как первичные миобласты человека и дифференцированные кардиомиоциты, адекватные клеточные модели для изучения десминовой миопатии и кардиомиопатии труднодоступны, что существенно тормозит поиск новых терапевтических и диагностических подходов.

В физиологическом состоянии функция митохондрий регулируется множеством физических и биохимических факторов, таких как концентрация аденозиндифосфата (АДФ) и ионов  $Ca^{2+}$ , рН клетки, величина мембранного потенциала. Среди них значительное внимание уделяется цитоскелетно-митохондриальным взаимодействиям как потенциальному регулятору структуры и функции митохондрий. Зависимость структуры митохондрий от функции цитоскелетных белков впервые была показана более 20 лет назад [335]. Однако механизм, посредством которого цитоскелетные белки и, в частности десмин, могут влиять на митохондриальную функцию, не расшифрован. Показано, что функция митохондрий зависит от их формы, а также от степени натяжения или сжатия наружной митохондриальной мембраны [75]. Поскольку эти характеристики могут определяться цитоскелетными белками клетки, это может являться одним из потенциальных механизмов, обеспечивающих влияние цитоскелета на функцию митохондрий. Однако точный механизм и конкретные биохимические взаимодействия, определяющие связь цитоскелетных белков, в частности десмина, с наружной мембраной митохондрий, не известны. Одной из гипотез является предположение о том, что дезорганизация или полное отсутствие десмина приводит к нарушению целостности наружной мембраны митохондрий и контроля ее проницаемости для АДФ [244]. Важность изучения митохондриально-цитоскелетных взаимодействий обуславливается также возможностью влияния

цитоскелетных белков, и, в частности, десмина, на процесс вызываемого митохондриями апоптоза. Известно, что изменение физических свойств наружной мембраны митохондрий и ее проницаемости для различных ионов может приводить к отеку митохондриального матрикса, разрыву наружной митохондриальной мембраны и высвобождению в цитоплазму таких триггеров апоптоза, как цитохром С и фактор индукции апоптоза [328]. Показано, что в экспериментальной модели десминовой кардиомиопатии одним из ведущих механизмов развития дисфункции миокарда является вызываемый митохондриями апоптоз кардиомиоцитов вследствие отека митохондриального матрикса [51, 265]. Проведенные нами ранее работы на трансгенных мышах, несущих L345P мутацию в гене *DES*, показали, что при стимуляции миоцитов и кардиомиоцитов в митохондрии мутантных животных попадает больше ионов  $Ca^{2+}$ , чем в клетки животных дикого типа. Высвобождение кальция также идет в мутантных клетках медленнее, чем в нормальных [216]. Однако более точные механизмы взаимодействия десмина с наружной мембраной митохондрий, а также роль десмина в процессе апоптоза, вызываемого митохондриями, и регуляции клеточного дыхания на сегодняшний момент не определены. В связи с этим детальное изучение связи между десмином и структурой и функциями митохондрий представляется актуальным и важным как для изучения патогенеза десминовых кардиомиопатий, так и для понимания более общих и фундаментальных внутриклеточных процессов в целом. Понимание этого процесса поможет выявить новые терапевтические агенты для лечения кардиомиопатий, связанных с мутациями генов, кодирующих белки промежуточных филаментов.

Известно, что при миофибриллярных миопатиях и кардиомиопатиях, характеризующихся образованием десмин-положительных белковых агрегатов, часто наблюдаются нарушения ритма и проводимости сердца [149]. Однако молекулярный механизм, связывающий образование агрегатов и нарушение электрической активности сердца, до сих пор не выявлен. Известно, что одним из компонентов агрегатов является  $\alpha$ B-кристаллин, отвечающий за укладку белков цитоскелета и способный регулировать активность ионных каналов.  $\alpha$ B-

кристаллин относится к семейству малых белков теплового шока, экспрессирующихся на высоком уровне в сердце и скелетной мускулатуре [153].  $\alpha$ B-кристаллин играет роль шаперона и в норме, связываясь с десмином и актином, поддерживает целостность цитоскелета [153]. Мутации в гене *CRYAB*, кодирующем  $\alpha$ B-кристаллин, приводят к развитию фенотипа десминовой кардиомиопатии с характерным образованием электронноплотных десмин-положительных агрегатов [153, 312]. Известно, что  $\alpha$ B-кристаллин способен регулировать плотность натриевого тока, препятствуя интернализации  $\alpha$ -субъединицы сердечного натриевого канала Nav1.5 и снижая ее убиквитинирование убиквитин лигазой Nedd4-2 [182]. Таким образом,  $\alpha$ B-кристаллин может являться связующим звеном между цитоскелетом и электрической системой кардиомиоцита. Существует единственная работа, посвященная исследованию молекулярных механизмов нарушений ритма при десминовых и филаминовых кардиомиопатиях [182], в связи с чем исследование молекулярных механизмов дисфункции ионных каналов, в частности канала Nav1.5, кодируемого геном *SCN5A*, при патологии цитоскелетных белков и белков области Z-дисков в модели индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) является актуальной научно-клинической задачей.

### **1.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене ламина A/C (*LMNA*)**

Научный интерес к ядерным ламинам — белкам внутренней ядерной оболочки — существенно возрос после открытия мутаций в гене ламина A/C в качестве причины развития целой группы заболеваний, в частности кардиомиопатий, миодистрофии Эмери–Дрейфуса, конечностно-поясничной миодистрофии, семейной липодистрофии и прогерии Хатчинсона–Гилфорда (синдрома преждевременного старения) [232]. Для большинства ламинопатий, таких, например, как миодистрофия Эмери–Дрейфуса, кардиомиопатия и прогерия, на сегодняшний момент не существует этиотропной терапии, что ведет

к ранней инвалидизации и гибели больных в раннем возрасте. Так, например, среди больных, перенесших трансплантацию сердца, примерно 10% составляют больные с кардиомиопатиями, вызванными мутациями в гене ламина А/С [196]. Несмотря на большое количество исследований в области ядерных ламинов, на сегодняшний момент нет общепринятого представления о патогенезе данной группы заболеваний. Учитывая то, что ламины экспрессируются во всех типах дифференцированных клеток, представляется неясным избирательное поражение преимущественно мышечной, жировой и костной тканей. Несмотря на большую актуальность данных исследований в связи с тяжестью течения и неблагоприятным прогнозом большинства ламинопатий, механизмы, посредством которых ядерные ламины вызывают развитие столь различных на первый взгляд заболеваний с поражением разных систем и органов, остаются нераскрытыми [2, 6-8, 24, 41, 232]. Актуальность исследований в данной области продиктована также потенциальной возможностью разработки терапевтических подходов на основе выяснения основных механизмов патогенеза данных заболеваний.

Ядерные ламины являются составной частью ядерной оболочки, состоящей из ядерной мембраны, комплекса ядерных пор и ядерной ламины [431]. Ядерная ламина представляет собой сеть из белков ламинов — представителей группы ПФ, выполняющих внутреннюю поверхность ядерной мембраны. Длительное время считалось, что ламины выполняют исключительно механическую роль, обеспечивая структурную целостность ядерной оболочки и ее устойчивость к деформации. Это подтверждалось выявлением структурных аномалий ядра у больных с ламинопатиями [54]. Однако исследования последних 15 лет значительно расширили данные представления о функциях ламинов. В последнее время функции ядерных ламинов рассматривают более широко, нежели исключительно в рамках механистической теории о поддержании целостности оболочки клеточного ядра. Показано участие ламинов в процессах передачи сигнала и механотрансдукции путем интеграции через ламин-ассоциированные белки с цитоплазматической системой цитоскелета [286, 431]. Обеспечение данных функций определяется взаимодействием ламинов с рядом ламин-ассоциированных



белков, транскрипционных факторов и хроматином [361]. Доказано участие ядерных ламинов в пространственной организации хроматина, регуляции экспрессии генов и процессах передачи сигнала, а также в регуляции репликации ДНК [111]. Получены единичные данные о влиянии ядерных ламинов на процесс дифференцировки клеток, в частности в мезенхимном направлении. О роли ламина А/С в данном процессе косвенно свидетельствует и тот факт, что в отличие от ламина В1 и В2, конститутивно определяющихся во всех видах клеток, экспрессия гена ламина А/С отсутствует в эмбриональных стволовых клетках и стволовых клетках крови и начинается только в процессе их тканевой дифференцировки. С этой позиции интересным представляется то, что при большинстве ламинопатий поражаются преимущественно ткани мезенхимального происхождения: миокард, мышечная, жировая и костная ткани [336], что делает крайне актуальными исследования влияния ламина А/С на процесс дифференцировки мезенхимных стволовых клеток. В настоящий момент опубликованы данные всего нескольких исследований, проводившихся в этом направлении [336, 359, 440]. Несмотря на большой объем и информативность данных, полученных в этих исследованиях, необходимо отметить, что они проводились с использованием siRNA-нокаутных клеточных линий и иммортализованных первичных культур клеток больных прогерией. В первом случае данная модель основана на полном отсутствии экспрессии ламина в клетках, что не отражает физиологическую ситуацию, наблюдаемую при ламинопатиях. Во втором — не может быть экстраполирована на большинство наиболее клинически значимых ламинопатий, поскольку патогенез прогерии связан с нарушением посттрансляционной модификации ламинов, а не с влиянием мутаций на структуру и функцию белка. Таким образом, изучение влияния мутаций в гене ламина А/С на процесс дифференцировки мезенхимных стромальных клеток жировой ткани в миогенном, адипогенном и остеогенном направлениях является крайне актуальным. Противоречивые данные получены как в отношении наиболее «уязвимого» направления дифференцировки стволовых клеток при ламинопатиях, так и в отношении задействованных в этом процессе сигнальных каскадов. Так, P. Scaffidi с соавторами показали снижение

дифференцировочного потенциала мезенхимных стволовых клеток в адипогенном направлении под влиянием прогерина (мутантной формы ламина А/С, вызывающей развитие прогерии), в то же время R. Akter с соавторами, напротив, показали увеличение адипогенного потенциала при снижении способности к остеогенной дифференцировке [58, 359]. Существующие противоречия касаются и основных сигнальных механизмов, задействованных в дифференцировке мезенхимных стволовых клеток, на фоне мутаций в гене *LMNA*. Так, P. Scaffidi с соавторами показали активацию компонентов каскада Notch1 и его транскрипционных факторов *Hey* и *Hes* в мезенхимных стволовых клетках при ламинопатиях, в то время как J. Zhang и соавторы не смогли подтвердить эти данные [359, 440]. Несомненным представляется влияние ламина А/С на процесс индукции остеогенной дифференцировки, однако различными исследователями показаны различные эффекторы данного процесса, в частности транскрипционные факторы *RUNX2*, *RANKL*, остеопротегерин, остеокальцин и костный сиалопротеин *BSP*. Важным направлением исследования в данной области является изучение первичных свойств мезенхимных стволовых клеток, несущих мутации в гене ламина А/С, а также их дифференцировочный потенциал в миогенном, адипогенном и остеогенном направлениях путем специфической индукции дифференцировки. Раскрытие механизмов влияния ядерных ламинов на свойства и функции прогениторных клеток, их пролиферативный и дифференцировочный потенциал, создаст основу для дальнейшей разработки фундаментальных подходов к клеточной терапии данной тяжелой группы заболеваний. Известно, что для ряда врожденных заболеваний с поражением мезенхимных тканей, например для миодистрофии Дюшена и Беккера, уже существуют возможности терапевтического лечения, основанного на применении клеточной и генной терапии. Для расширения данного спектра врожденной патологии и возможного применения клеточной терапии при ламинопатиях необходимо проведение фундаментальных исследований о влиянии ламинов на процесс дифференцировки клеток. Таким образом, изучение направленной дифференцировки миоцитов, адипоцитов и остеоцитов на фоне мутаций в гене

*LMNA* представляется весьма актуальным как с точки зрения фундаментальной биологии, так и с точки зрения потенциала практического применения.

### **1.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене сердечного тропонина I (*TNNI3*)**

Тропонин I является одним из компонентов тропонин-тропомиозинового комплекса и отвечает за  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительное ингибирование актин-миозинового взаимодействия. Мутации в гене сердечного тропонина I (*TNNI3*) были описаны одними из первых среди причин развития РКМП наряду с мутациями в генах, кодирующих цитоскелетные и структурные белки. Вслед за описанием мутаций в гене *TNNI3* при ГКМП [204] были опубликованы первые данные о роли гена *TNNI3* в развитии РКМП [281]. К настоящему моменту в базе данных ClinVar описано более 60 патогенных и вероятно-патогенных вариантов, ассоциированных с гипертрофической, рестриктивной и дилатационной кардиомиопатиями, из которых 10 характерны для развития именно рестриктивного фенотипа. Всего же описано более 12 вариантов в гене *TNNI3*, включая варианты неопределенной значимости, ассоциированные с РКМП [280].

Наиболее общепризнанным молекулярным механизмом дисфункции кардиомиоцитов вследствие нарушения структуры тропонина I является увеличение чувствительности саркомера к ионам кальция [94]. Большинство исследований, посвященных изменению биофизических свойств мутантных форм тропонина I, проведены с использованием системы восстановленного в растворе актомиозинового комплекса, а также безмембранных миофибрилл. В этих исследованиях было показано, что мутантные формы белка обладают пониженной способностью ингибировать актомиозиновую АТФ-азу и актомиозиновый комплекс, имеют повышенную чувствительность к ионам  $\text{Ca}^{2+}$  [119, 125, 198, 212,

384]. В работах *in vitro* также было показано замедление процесса изометрического расслабления миофибрилл и увеличение потребления ими энергии [201, 231, 427].

Большинство из описанных патогенных вариантов по механизму являются точечными, однако предполагаемые молекулярные механизмы действия мутаций различаются в зависимости от локализации аминокислотной замены. В частности, различными представляются механизмы воздействия мутаций, затрагивающих ингибиторный регион белка, и мутаций дистальной части гена. Это приводит к различиям в изменении биофизических свойств миофиламентов и, как следствие, к различию в клинической картине заболевания, обуславливая преобладание рестриктивного, гипертрофического или дилатационного фенотипов. При повреждении ингибиторного участка молекулы основным следствием является уменьшение ингибиторного влияния тропонина I на тонкие филаменты и актин-тропомиозин-активированную миозиновую АТФ-азу. Вследствие этого даже в процессе диастолы при низкой цитоплазматической концентрации ионов  $Ca^{2+}$  тонкие филаменты частично остаются связанными с миозином. Это приводит к нарушению изовольномической релаксации и раннему быстрому диастолическому заполнению левого желудочка. Клинически это проявляется развитием диастолической дисфункции и снижением максимальной силы сокращения миокарда.

Противоположный эффект может наблюдаться при снижении чувствительности миофиламентов к ионам  $Ca^{2+}$ , что происходит при ряде мутаций, вызывающих развитие дилатационного фенотипа [272]. Сходный эффект был продемонстрирован и вследствие фосфорилирования тропонина I под действием протеинкиназы A, в частности серина в положении 22/23 [375, 423]. При этом у пациентов с систолической дисфункцией и сердечной недостаточностью со сниженной сократимостью миокарда наблюдается снижение степени фосфорилирования серина в положении 22/23. Данный эффект, вероятно, носит компенсаторный характер и направлен на увеличение инотропной функции миокарда в условиях развития систолической дисфункции [166, 440]. Таким образом, фосфорилирование тропонина является одним из механизмов

регулирования сократимости кардиомиоцитов посредством изменения чувствительности актин-тропонин-тропомиозинового комплекса к ионам кальция [184]. Фосфорилирование тропонина I в основном происходит посредством протеинкиназы A — основного компонента сигнального каскада, запускаемого симпатической стимуляцией посредством активации бета-адренорецепторов и увеличения внутриклеточной концентрации циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [169]. При активации симпатической нервной системы посредством вышеописанного каскада событий происходит усиление фосфорилирования аминокислотных остатков тропонина I в положении 22/23, что приводит к увеличению степени расслабления и силы сокращения миокарда и усилению хронотропного эффекта [233, 333]. Важно отметить, что субстратом протеинкиназы A также является и миозин-связывающий белок C (МуВРС) — еще один компонент актин-тропонин-тропомиозинового комплекса, отвечающий за структурное обеспечение его целостности и модулирующий инотропный и лузитропный эффекты симпатической стимуляции [393, 394]. Известно, что фосфорилирование миозин-связывающего белка C ослабляет его взаимодействие с S2 фрагментом тяжелых цепей миозина и тем самым облегчает взаимодействие миозина с актиновыми филаментами [155, 228]. Поэтому фосфорилирование МуВРС под действием протеинкиназы A приводит к усилению взаимодействия актина с миозином обеспечивая реализацию инотропного эффекта [106]. Таким образом, одновременно несколько белков актин-тропонин-тропомиозинового комплекса являются субстратами протеинкиназы A, и их фосфорилирование обеспечивает модулирующий эффект в отношении сократительных свойства миокарда.

Несмотря на значительную представленность МуВРС в структуре саркомера, детальный спектр структурных и молекулярных взаимодействий для него остается мало раскрытым [351]. Показано, что некоторые фрагменты молекулы МуВРС напрямую взаимодействуют с миозином, а также актином и тропомиозином [79, 227, 290]. На сегодняшний момент не существует убедительных данных о прямом взаимодействии МуВРС с молекулами тропонинов несмотря на то, что эффект

MyВРС на активацию тонких филаментов был неоднократно продемонстрирован [337].

Изменение сократительной и луситропной функций миокарда вследствие мутаций в генах, кодирующих белки тропонинового комплекса, посредством нарушения процесса их фосфорилирования была впервые показана для ГКМП [112, 113, 121, 230, 251]. Впоследствии этот механизм был продемонстрирован и для ДКМП [251, 272], а также для заболеваний миокарда ишемического генеза [189]. В то же время изменение чувствительности белков тропонинового комплекса к ионам кальция вследствие динамики их статуса фосфорилирования может являться не только молекулярным механизмом развития заболевания, но и ключом к терапевтическим подходам. Так, в исследованиях на животных моделях с одновременным введением фосфомиметиков в положение 22/23 тропонина I и созданием усеченного фрагмента тропонина I без ингибиторного региона было показано, что эффект снижения комплаентности миокарда вследствие невозможности фосфорилирования тропонина I может быть скорректирован за счет удаления из структуры молекулы ингибиторного региона [246]. Данный генно-инженерный подход требует коррекции генетического материала в терминально дифференцированных клетках — кардиомиоцитах, поэтому пока является малоприменимым в клинической практике. Однако принцип направленной генетической коррекции, положенный в его основу, может дать начало перспективному направлению исследования и поиску новых терапевтических подходов при условии определения оптимального метода генетической модификации клеток миокарда.

Результаты, полученные с использованием модели трансгенных животных, также подтверждают гипотезу о ведущей роли нарушения чувствительности к ионам  $Ca^{2+}$  в патогенезе кардиомиопатий на фоне мутаций тропонина I и десмина [246, 372]. При этом мутациям в гене десмина отводится большая роль в нарушении внутримитохондриального кальциевого гомеостаза, а мутациям в гене тропонина I — в нарушении цитоплазматического кальциевого обмена и в изменении чувствительности миофибрилл к ионам кальция. Недавние исследования с

применением биоинформатического анализа и комплексной оценки метаболических путей также показали изменения в основных метаболических путях кардиомиоцитов под действием мутаций в *TNNI3*. В частности, отмечено снижение уровня окисления жирных кислот и повышение утилизации глюкозы вследствие реализации гипертрофической программы кардиомиоцитов, несущих мутантные формы *TNNI3* [432].

Несмотря на большое количество опубликованных случаев мутаций в гене тропонина I, четких корреляций генотипа и фенотипа среди описанных случаев провести не удастся. Носители мутаций в гене тропонина I имеют большую вариабельность в отношении возраста дебюта заболевания, степени пенетрантности, особенностей электрокардиограммы (ЭКГ), степени гипертрофии левого желудочка и прогноза заболевания [280]. Даже внутри семьи среди носителей одной и той же мутации наблюдается значительная вариабельность клинической картины, что затрудняет формирование прогностических критериев при обнаружении патогенных замен в гене *TNNI3*. Чаще всего такая внутрисемейная вариабельность наблюдается среди форм РКМП и ГКМП. Так, зачастую среди членов одной и той же семьи — носителей одинаковой мутации — заболевание проявляется как гипертрофическим, так и рестриктивным фенотипом [437]. Среди всех описанных мутаций в *TNNI3* для некоторых описаны как рестриктивные, так и гипертрофические формы кардиомиопатий [280]. Особенно характерным является сочетание признаков РКМП и ГКМП (умеренная гипертрофия миокарда на фоне выраженного рестриктивного типа трансмитрального кровотока и гипертрофии предсердий) в детской возрастной группе. Это подтверждается данными Kaski и соавторов о частом сочетании признаков РКМП с ГКМП, структурными аномалиями сердца и некомпактным миокардом левого желудочка в детской возрастной группе, а также преобладанием среди РКМП с дебютом в детском возрасте случаев, обусловленных мутациями в генах саркомерных белков, и в частности тропонина I [197]. Ранний возраст дебюта РКМП на фоне мутаций в гене *TNNI3*, в том числе развитие заболевания в раннем

детском возрасте, неоднократно было продемонстрировано многими исследователями [99, 115, 437].

Наблюдение о схожести некоторых механизмов развития РКМП и ГКМП находит свое подтверждение и на морфологическом уровне. Так, в некоторых работах у пациентов с РКМП был описан типичный феномен дискомплексации (disarray), ранее считавшийся атрибутом исключительно ГКМП [119, 141, 281, 437]. Перечисленные наблюдения легли в основу предположения о том, что РКМП является фенотипическим вариантом ГКМП, а не самостоятельным заболеванием. Эта гипотеза отчасти находила подтверждение в общности генетического фона (мутации в генах, кодирующих саркомерные белки) и некоторых морфологических характеристик (феномен disarray), сходности изменений чувствительности к ионам кальция и нередком сочетании обоих вариантов кардиомиопатий внутри одной семьи [225, 331]. Однако наличие альтернативного молекулярного механизма развития РКМП вследствие мутаций в генах, кодирующих цитоскелетные и структурные белки, а также возможность развития РКМП при болезнях накопления и инфильтративных заболеваниях явились достаточным аргументом для сохранения этой нозологической формы в виде отдельного варианта кардиомиопатий.

### **1.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции**

Исследование молекулярных механизмов кардиомиопатий позволяет не только раскрыть патогенез наследственных заболеваний сердца, но и приблизиться к пониманию общих закономерностей развития таких универсальных процессов в миокарде, как гипертрофия, дилатация и изменение комплаентности. Это важно для понимания патогенеза изменений в миокарде при мультифакториальных заболеваниях — артериальной гипертензии, ИБС, сахарного диабета и ожирения. Поиск генетических детерминант, определяющих ремоделирование сердца при ИБС и артериальной гипертензии, ведется на протяжении многих лет. Одними из



первых в данной области были исследованы гены-модификаторы, относящиеся к системе ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС): ген ангиотензинпревращающего фермента, ген ангиотензина II, ген ренина. Исследование этих генетических детерминант происходило с использованием подхода кандидатных генов. Несмотря на большое количество проведенных исследований и опубликованных работ, убедительных и однозначных данных о влиянии генетических вариантов генов РААС на ремоделирование миокарда получено не было [81, 206, 373]. Вместе с тем возможность проведения широкогеномных исследований, которая появилась после 2005 года в связи с расшифровкой и публикацией данных о геноме человека, привела к идентификации новых генов и локусов, определяющих ремоделирование миокарда и ассоциированных с развитием систолической дисфункции, гипертрофии миокарда и фибрилляции предсердий [92, 371, 378, 413]. Зачастую определенные таким образом гены и локусы не имели четко описанной функции, и роль их в патогенезе заболеваний миокарда не являлась очевидной без проведения дополнительных функциональных и экспериментальных исследований. Именно таким образом были идентифицированы гены *HSPB7*, *BAG3*, *USP3* и *FRMD4B* и ассоциация их генетических вариантов (rs1739843, rs2234962, rs10519210 и rs6787362) с развитием систолической сердечной недостаточности. Важно отметить, что ряд идентифицированных таким образом генов, в частности гены *BAG3* и *HSPB7*, являются компонентами системы протеостаза и обеспечивают поддержание целостности и своевременную утилизацию структурных белков саркомера и Z-дисков [194, 274]. Эти наблюдения способствовали возвращению научного интереса к генам, кодирующим структурные и сократительные белки кардиомиоцитов, и поиску их генетических вариантов, определяющих тип ремоделирования миокарда, процессы гипертрофии и дилатации.

Несмотря на успехи, достигнутые в области определения генетических предикторов дилатационного фенотипа, количество работ, посвященных генетическим детерминантам диастолической дисфункции и рестриктивного фенотипа, крайне мало. В основе диастолической дисфункции миокарда лежит

комплекс факторов, ключевыми из которых являются жесткость внеклеточного матрикса и соотношение различных форм тайтина, а также степень его фосфорилирования [133, 164, 219, 241, 446]. Показано, что одним из атрибутов развития сердечной недостаточности с сохранной фракцией выброса является изменение статуса фосфорилирования тайтина и спектра его сплайсинговых изоформ [165, 223, 224]. Однако до настоящего времени не было получено данных о связи генетических вариантов *TTN* с развитием диастолической дисфункции миокарда и сердечной недостаточностью с сохранной фракцией выброса. Принимая во внимание тот факт, что тайтин и белки области Z-диска, с которыми он взаимодействует, являются ключевыми участниками процесса механотрансдукции, а сигнальные каскады, инициированные в данной области клетки, приводят к развитию гипертрофии и усилению синтеза сократительных белков саркомера, возможно предположить наличие связи генетических вариантов в перечисленных белках с развитием процесса гипертрофии и диастолической дисфункции [218]. Данное предположение неоднократно находило подтверждение в работах различных авторов [227, 285, 295, 380, 416]. Однако в целом количество работ, посвященных генетическим предикторам развития диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока, значительно меньше по сравнению с исследованиями генетических детерминант дилатации миокарда и систолической дисфункции [316, 433].

Ключевым событием в области исследования молекулярных механизмов систолической и диастолической дисфункции явилась расшифровка последовательности и механизма сплайсинга гена тайтина (*TTN*). Ген тайтина является самым большим в геноме человека, состоит из более 300 экзонов и кодирует белок молекулярной массой 3000 кДа. Основной функцией тайтина является обеспечение эластических свойств саркомера и регуляция степени его растяжения [96, 143, 211, 252, 367]. Последнее обеспечивается за счет пространственного расположения тайтина вдоль миофиламентов и заякоривания в области Z-дисков путем взаимодействия с целым комплексом ассоциированных с Z-диском белков. В силу огромного размера гена *TTN* единичные нуклеотидные

замены, в том числе и уникальные для каждого человека, встречаются в нем с большой частотой и редко ассоциированы с развитием патологии. Большой вклад в структуру и функции тайтина вносят укорачивающие белок мутации по типу сплайсинговых и мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Изменение длины молекулы тайтина путем регулирования сплайсинговых событий одновременно с его фосфорилированием является ключевым механизмом, определяющим комплаентность саркомера, силу его пассивного растяжения и, соответственно, силу сокращения миофибрилл. Таким образом, регуляция экспрессии форм тайтина посредством альтернативного сплайсинга в значительной мере обеспечивает ответ миокарда на гемодинамический стресс. Укорачивающие варианты гена тайтина встречаются в популяции с частотой 0,5–3% [57, 147, 346]. В нескольких исследованиях было показано, что их наличие ассоциировано с высоким риском развития дилатации миокарда при таких стрессовых воздействиях и гемодинамических нагрузках, как химиотерапия и беременность [253, 421]. Ключевыми работами в данной области явились публикации, в которых было показано, что среди здоровой популяции носители укорачивающих вариантов *TTN* имеют большие размеры камер сердца вне патологического состояния [360]. Также с использованием экспериментальной животной модели авторам удалось показать, что включение укороченных форм тайтина в структуру саркомера изменяет основные пути метаболизма кардиомиоцитов и делает миокард более чувствительным к повреждению. Сплайсинг *TTN* обеспечивается несколькими белками, основным из которых является белок *RBM20* [425]. Помимо сплайсинга *TTN*, данный белок участвует в регуляции сплайсинга генов, кодирующих и другие высокомолекулярные белки миокарда, в частности *DTN2*, *FLNC*, *TRDN*, *CAMK2D*, *LDB3*, тем самым в большой степени определяя комплаентность и растяжимость волокон миокарда [158]. Мутации в гене *RBM20* неоднократно были продемонстрированы в связи с развитием тяжелых форм дилатационной кардиомиопатии [74, 84, 200, 243, 379], а генно-инженерная модификация *RBM20* является перспективным подходом для коррекции диастолической и систолической дисфункции миокарда [152, 175, 276].

С учетом приведенных выше данных закономерно предположить, что генетические варианты в гене *RBM20* могут влиять на тип ремоделирования миокарда, а их поиск является актуальной клинической и научной задачей.

Одним из недавно описанных локусов, ассоциированных с диастолической дисфункцией миокарда, является локус 11p11.2, включающий в себя ген *MADD*, расположенный в непосредственной близости от гена *MYBPC3*. Показано, что вариант rs2290149 достоверно ассоциирован с развитием диастолической ХСН в исследуемой выборке пациентов Тайваньской популяции независимо от наличия синдрома артериальной гипертензии. Однако количество включенных в данное исследование пациентов было невелико (352 человека), что требует репликации полученных данных на больших выборках и в других этнических группах. Другим генетическим вариантом, описанным в связи с развитием диастолической сердечной недостаточности, является вариант rs2270915 гена *NPR3*, кодирующего рецептор клиренса натрийуретического пептида. В исследовании N. Pereira 2014 года на значительной выборке пациентов (1931 человек) была показана большая частота развития диастолической дисфункции у носителей гомозиготного генотипа GG по сравнению с носителями других генотипов [316]. До настоящего момента это исследование является единственным, посвященным роли данного генетического варианта в развитии диастолического типа кровенаполнения, и его репликация на других выборках пациентов, безусловно, является крайне актуальной.

### **1.8. Перспективы дальнейших научных исследований**

Наибольшей актуальностью и перспективностью в области изучения кардиомиопатий будут являться исследования, нацеленные на расширение спектра генетических причин и клеточно-молекулярных механизмов патогенеза заболевания, поиск корреляций между генотипом и фенотипом кардиомиопатий на больших когортах пациентов и разработка персонализированных подходов к определению прогноза и терапии данной генетически обусловленной патологии

миокарда. В настоящее время вклад причинных генетических детерминант в прогноз заболевания наиболее четко показан для ГКМП и в меньшей степени определен для других вариантов кардиомиопатий. Выделение с учетом данных о генетической природе заболевания групп высокого риска с потребностью в высокотехнологичных видах медицинской помощи среди пациентов с АКМП, РКМП и НЛЖ является актуальной клинической и научной задачей, решение которой в перспективе позволит оптимизировать ведение пациентов с КМП различных возрастных группах.

Получение данных о молекулярных механизмах генетически обусловленных заболеваний в перспективе может определить направления разработки новых таргетных терапевтических препаратов при врожденных заболеваниях миокарда. Данные подходы в настоящее время тестируются при системных заболеваниях с нарушением обмена, наследственном амилоидозе и ряде нейромышечной патологии. Причем разработка таргетной терапии может быть направлена на модулирование как общих патогенетических механизмов (стимуляция и ингибирование аутофагии, снижение степени внутриклеточного воспаления, подавление биосинтеза белка), так и на создание геннотерапевтических продуктов. В настоящее время работы в области геномного редактирования с использованием вирусных носителей имеют ряд препятствий для широкого клинического применения данной технологии. К ним относится, прежде всего, отсутствие оптимальной системы доставки системы геномного редактирования в клетки млекопитающих. Наиболее перспективным способом с достаточной степенью эффективности и специфичности сегодня является система вирусной доставки с использованием аденоассоциированных вирусов в качестве носителя [163, 263, 381]. Именно с использованием данной системы сегодня проведено наибольшее количество доклинических исследований и исследований 1 фазы, а существование различных субтипов вируса позволяет обеспечивать его различный тканевой тропизм к тканям человека и животных. В связи с этим детальная расшифровка молекулярных механизмов кардиомиопатий даст возможность идентификации универсальных внутриклеточных механизмов

патогенеза и создания в будущем персонифицированных геннотерапевтических препаратов.

Отсутствие крупных регистров пациентов с РКМП, включающих более сотни клинически охарактеризованных и генотипированных пациентов, является существенным препятствием для создания системы оценки риска при данной патологии. В то же время очевидным является и тот факт, что общепринятые шкалы прогноза, разработанные в основном на когортах пациентов с ХСН ишемического генеза, не могут быть равноценно применены при различных типах КМП и в различных возрастных группах. Более того, в литературе отсутствуют сведения о возможности использования или о создании подобных шкал прогноза ХСН у пациентов детской возрастной группы. Таким образом, создание и валидирование подобных шкал с учетом детальных знаний о генотипе пациента является крайне перспективным при ряде кардиомиопатий, в частности при РКМП и АКМП.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Формирование группы пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией (РКМП)

Дизайн первой части исследования, посвященной изучению особенностей клинического течения и генетического спектра РКМП, состоял из проспективного наблюдения группы пациентов с идиопатической РКМП с одновременным проведением генетического обследования. В группу были включены 35 пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией, наблюдаемым на базе ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» в период с 2003 по 2018 год. Исследование было одобрено локальным этическим комитетом и проведено в соответствии с Хельсинской декларацией. Основным критерием включения в группу являлся диагноз идиопатической РКМП, который ставился в соответствии с критериями ВОЗ и классификацией Европейского общества кардиологов [343]. В детскую группу были включены пациенты с РКМП, у которых дебют заболевания (впервые выявленная клиническая картина ХСН или нарушения ритма) состоялся в возрасте до 18 лет. В данной группе диагноз ставили на основании эхокардиографических признаков РКМП, таких как дилатация предсердий в сочетании с нормальной или практически нормальной толщиной миокарда левого желудочка и сохранной или минимально сниженной фракцией выброса левого желудочка (КДРЛЖ z-индекс  $\leq 3$ , задняя стенка левого желудочка (ЗСЛЖ) z-индекс  $\leq 3$ , фракция укорочения  $\geq 25\%$ ). В исследование также включали пациентов с сопутствующими пороками сердца — дефектами межпредсердной перегородки (ДМПП), дефектами межжелудочковой перегородки (ДМЖП) и открытым артериальным протоком (ОАП), а также пациентов с сопутствующей нейромышечной патологией или признаками синдромальной патологии. Критериями невключения являлись наличие установленных приобретенных причин РКМП, таких как AL-амилоидоз, констриктивный перикардит, карциноид, предшествующее лучевое воздействие. Наличие генетически-подтвержденного транстиретинового амилоидоза также

являлось критерием исключения. Исключение вышеперечисленных причин РКМП проводили при помощи детального сбора анамнеза, биохимического исследования, включающего электрофорез белков сыворотки крови, цитологического исследования красного костного мозга, МРТ сердца и биопсии миокарда.

## **2.2. Формирование группы пациентов с ХСН с целью изучения ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа**

Критериями включения в группу являлось наличие у пациента ХСН в соответствии с критериями ESC 2016 [323] (включались пациенты как с СН-нФВ так и с СН-сФВ, а также СН-пФВ), развившейся на фоне артериальной гипертензии, факторов кардиометаболического риска, а также ИБС. Критериями невключения в группу являлись: наличие идиопатических форм КМП, наличие КМП, ассоциированных с системными заболеваниями, транстретиновым и AL-амилоидозом, наличие миокардита, наличие перенесенного ИМ, наличие постоянной формы ФП.

## **2.3. Секвенирование нового поколения**

ДНК выделяли из цельной крови при помощи коммерческого набора FlexiGene Kit (SelectScience, США) в соответствии с инструкцией производителя, с дополнительным этапом обработки РНКазой (Qiagen, США). Затем по 200 нг ДНК каждого пациента обрабатывали 8 парами рестрикционных ферментов при температуре 37 °С в течение 16 часов. Качество проведенной рестрикции оценивали с помощью капиллярного биоанализатора (Agilent, США) и набора для высокоточного определения количества ДНК High Sensitivity DNA assay (Agilent, США). Последующую амплификацию для приготовления финальных библиотек перед секвенированием проводили при помощи высокоточной полимеразы Herculase II Fusion (Agilent, США). Очистку продуктов рестрикции и



амплификации проводили с использованием набора адсорбционных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, США). Концентрацию амплифицированных библиотек определяли при помощи биоанализатора 2100 (Agilent, США) и набора для высокоточного определения количества ДНК High Sensitivity DNA assay (Agilent, США). Созданные библиотеки с индивидуальными баркодами в дальнейшем объединяли в равных количествах в концентрации 8 пМ. Секвенирование (2 запуска по 250 прочтений) производили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов версии 2 и версии 3. Данные, полученные в виде VCF-файлов, аннотировали с использованием программного обеспечения Annotator. В качестве референсных баз данных для определения частот редких генетических вариантов использовали базы данных Exac02 и GnomAD.

Для достижения высокой степени покрытия при секвенировании исследуемых генов использовали последовательности всех кодирующих регионов генов, когда-либо описанных в связи с развитием всех типов кардиомиопатий, а также генетически обусловленных нарушений ритма и проводимости. Полный список исследуемых генов представлен в Таблице 2. Последовательности генов определяли в соответствии с международными базами данных RefSeq, Ensembl, CCDS, Gencode, VEGA, SNP, CytoBand. Выбранные последовательности составили в сумме 426 332 пар нуклеотидов, которые были обработаны с помощью программного пакета SureSelect (Agilent Technologies, США) с целью подбора специфичных олигонуклеотидных последовательностей для реакции целевого обогащения. Для увеличения плотности прочтения в районах неоптимального покрытия проводили оптимизацию вручную. В результате было синтезировано 19 956 целевых зондов, покрывающих последовательность ДНК итоговым размером 424 430 пар оснований.

Таблица 2 — Список генов, включенных в целевую панель при анализе генетических вариантов методом секвенирования нового поколения

Ген	Хромосомная локализация	% покрытия гена	Количество покрытых фрагментов гена
ABCC9	chr12:21953968-22089618	100,00	41
ACTC1	chr15:35082603-35087019	100,00	6
ACTN2	chr1:236849964-236925929	99,82	23
AKAP9	chr7:91570404-91739483	99,93	52
ANK2	chr4:113825640-114309894	100,00	58
ANKRD1	chr10:92672613-92680794	100,00	9
BAG3	chr10:121411178-121436804	100,00	5
BRAF	chr7:140426284-140624513	100,00	21
CACNA1C	chr12:2162719-2800375	99,95	53
CACNA2D1	chr7:81579698-82072785	100,00	42
CACNB2	chr10:18429656-18828663	99,78	20
CALM1	chr14:90863565-90871071	100,00	7
CALR3	chr19:16589932-16606950	100,00	9
CASQ2	chr1:116243852-116311172	100,00	11
CAV3	chr3:8775553-8787563	100,00	2
CBL	chr11:119077118-119170501	100,00	16
CRYAB	chr11:111779478-111782458	100,00	3
CSRP3	chr11:19204207-19214005	99,85	5
DES	chr2:220283175-220290722	100,00	9
DMD	chrX:31132798-33357392	99,92	88
DMPK	chr19:46273729-46285639	100,00	16
DSC2	chr18:28647971-28681944	100,00	18
DSG2	chr18:29078205-29126716	100,00	15
DSP	chr6:7542139-7586121	100,00	25
DTNA	chr18:32335931-32470414	100,00	27
EMD	chrX:153607835-153609567	100,00	6
EYA4	chr6:133595909-133852374	100,00	21
FHL1	chrX:135251952-135292194	100,00	10
FHL2	chr2:105977730-106015563	100,00	8
FKTN	chr9:108337304-108402414	99,68	12
FXN	chr9:71650689-71714860	100,00	6
GAA	chr17:78078376-78093140	100,00	19
GLA	chrX:100652787-100662901	100,00	7
GPD1L	chr3:32148194-32207412	100,00	8
HCN4	chr15:73614812-73660621	100,00	8
HRAS	chr11:532626-534332	100,00	5
ILK	chr11:6625492-6631852	100,00	12

Ген	Хромосомная локализация	% покрытия гена	Количество покрытых фрагментов гена
JPH2	chr20:42743426-42815355	100,00	6
JUP	chr17:39775836-39928116	100,00	20
KCND3	chr1:112318689-112525358	100,00	7
KCNE1	chr21:35821533-35821942	100,00	1
KCNE1L	chrX:108867811-108868259	100,00	1
KCNE2	chr21:35742768-35743159	100,00	1
KCNE3	chr11:74168287-74168618	100,00	1
KCNH2	chr7:150642443-150675011	100,00	16
KCNJ2	chr17:68171171-68172474	100,00	1
KCNJ5	chr11:128781159-128786636	100,00	2
KCNJ8	chr12:21918647-21926560	100,00	2
KCNQ1	chr11:2466319-2869243	100,00	18
KRAS	chr12:25362719-25398328	100,00	5
LAMA4	chr6:112430630-112575362	100,00	44
LAMP2	chrX:119562329-119603034	100,00	11
LDB3	chr10:88428439-88492743	100,00	16
LMNA	chr1:156084700-156109640	99,71	16
MAP2K1	chr15:66679676-66782963	100,00	11
MAP2K2	chr19:4090586-4123882	100,00	11
MRPL3	chr3:131181557-131221837	100,00	12
MYBPC3	chr11:47353412-47374208	100,00	34
MYH6	chr14:23851239-23876442	99,44	37
MYH7	chr14:23882053-23902951	99,55	38
MYL2	chr12:111348871-111358343	88,61	6
MYL3	chr3:46899724-46904890	100,00	6
MYLK2	chr20:30407374-30421610	100,00	12
MYOM1	chr18:3067250-3215231	100,00	38
MYOZ2	chr4:120057671-120107365	100,00	5
MYPN	chr10:69866472-69970222	100,00	22
NEBL	chr10:21074666-21462772	100,00	34
NEXN	chr1:78381782-78408608	100,00	14
NF1	chr17:29422318-29705959	99,63	59
NOS1AP	chr1:162039958-162353331	100,00	13
NRAS	chr1:115251146-115258791	100,00	4
PDLIM3	chr4:186423438-186456598	99,45	9
PKP2	chr12:32945348-33049675	100,00	14
PLN	chr6:118880075-118880253	100,00	1
PRKAG2	chr7:151254277-151573715	99,87	19
PSEN1	chr14:73614718-73686007	100,00	11
PSEN2	chr1:227068337-227083290	100,00	11
PTPN11	chr12:112856906-112942578	100,00	16

Ген	Хромосомная локализация	% покрытия гена	Количество покрытых фрагментов гена
RAF1	chr3:12626003-12660230	99,57	17
RANGRF	chr17:8192097-8193264	100,00	4
RBM20	chr10:112404203-112595746	100,00	15
RYR2	chr1:237205812-237995957	99,70	110
SCN1B	chr19:35521715-35530615	99,64	5
SCN3B	chr11:123504841-123524519	100,00	5
SCN4B	chr11:118007732-118023398	100,00	5
SCN5A	chr3:38591802-38674808	99,73	28
SCO2	chr22:50962030-50962850	100,00	1
SDHA	chr5:218461-256545	97,59	15
SGCD	chr5:155756577-156186411	100,00	9
SHOC2	chr10:112724107-112771586	100,00	8
SLC25A3	chr12:98987747-98995316	100,00	8
SLMAP	chr3:57743369-57913125	100,00	24
SNTA1	chr20:31996303-32031436	100,00	8
SOS1	chr2:39212955-39347573	99,65	23
SPRED1	chr15:38545377-38643875	100,00	7
TAZ	chrX:153640171-153649353	100,00	10
TCAP	chr17:37821603-37822372	100,00	2
TGFB3	chr14:76425520-76447246	100,00	7
TMEM43	chr3:14166684-14183305	100,00	13
TMPO	chr12:98909537-98941646	100,00	10
TNNC1	chr3:52485281-52488041	100,00	6
TNNI3	chr19:55663192-55668967	100,00	8
TNNT2	chr1:201328328-201342392	100,00	21
TPM1	chr15:63335019-63363381	100,00	16
TRDN	chr6:123539736-123957930	98,85	48
TRPM4	chr19:49661114-49714765	100,00	25
TTN	chr2:179391729-179682294	98,80	346
VCL	chr10:75757956-75877977	100,00	22

## 2.4. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена десмина, для последующей генетической модификации мышечных клеток

Для создания информативной клеточной модели изучения патогенеза кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в гене десмина, нами были созданы несколько генетических конструкций, несущих нормальный и мутантные гены десмина.

## 2.5. Клонирование гена десмина с использованием конструкции на основе лентивирусного вектора

Ген десмина и ген зеленого флуоресцентного белка были клонированы в вектор pLVTHM (Рисунок 1). Для создания лентивирусных частиц использовали плазмиды, несущие пакующие и функциональные гены вируса иммунодефицита человека, сконструированные в лаборатории D. Trono (École Polytechnique Fédérale de Lausanne, Швейцария): psPAX2, pMD2.G, pLVTHM. Для клонирования гена интереса в плазмиду были выбраны уникальные сайты рестрикции — AscI (GG<sup>^</sup>CGCG<sub>\_</sub>CC) и SpeI (A<sup>^</sup>CTAG<sub>\_</sub>T). Последовательности праймеров для амплификации мышинового гена десмина, предназначенного для введения в вектор, приведены в Таблице 3, сайты рестрикции выделены подчеркиванием.

Таблица 3 — Последовательность праймеров для клонирования гена *DES* в лентивирусный вектор pLVTHM

Название праймера	Последовательность праймера
cAscI Fw	<u>GGC GCG CCT</u> TAA CCA TG
cSpeIRv	GTA CTT CAC GAC ATT <u>TGA TCA</u>

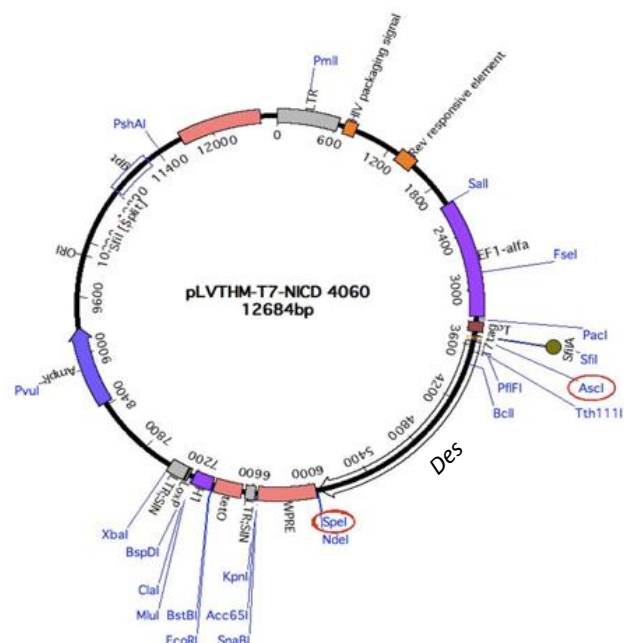


Рисунок 1 — Карта плазмиды pLVTHM

В реакции амплификации гена десмина использовали следующие компоненты:

- плазмидная ДНК — 2 мкл;
- буфер для Dream Taq-полимеразы 10× (Fermentas) — 5 мкл;
- праймер прямой 10 пМ — 3 мкл;
- праймер обратный 10 пМ — 3 мкл;
- дезокситрифосфаты 2,5 мМ — по 3 мкл каждого;
- Dream Taq-полимераза 2,5 е.а./мкл (Fermentas) — 0,3 мкл;
- вода, свободная от нуклеаз (Fermentas) — 30,7 мкл.

Реакцию проводили при следующих условиях:

- денатурация цепей ДНК — 5 минут при 95 °С;
- денатурация цепей ДНК — 30 секунд при 95 °С;
- отжиг праймеров — 1 минута при 55 °С;
- элонгация цепи — 1,5 минуты при 72 °С;
- предыдущие три шага повторяли 30 раз;
- финальная элонгация — 20 минут при 72 °С.

Аmplифицированный фрагмент массой 1500 п.н. соответствовал ожидаемому фрагменту мышиногo гена десмина. Этот фрагмент был выделен из геля и очищен с использованием набора GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

На втором этапе процесса клонирования мышиногo гена десмина была проведена обработка вектора, плазмиды и вставки гена десмина специфическими рестриктазами для создания липких концов, по которым впоследствии осуществляли лигирование. Обработку обеими рестриктазами проводили одновременно, поскольку для их работы используется один и тот же рабочий буфер.

В реакции рестрикции вектора использовали следующие компоненты:

- плазмидная ДНК 270 нг/мкл — 4 мкл;
- буфер Tango 10× (Fermentas) — 1,3 мкл;
- рестриктаза SpeI 10 е.а./мкл — 3 мкл;
- рестриктаза AscI 10 е.а./мкл — 3 мкл;
- вода — 1,7 мкл.

Рестриксию проводили 4 часа при 37 °С.

В реакции рестрикции вставки использовали следующие компоненты:

- плазмидная ДНК 10 нг/мкл — 50 мкл;
- буфер Tango 10× (Fermentas) — 7 мкл;
- рестриктаза SpeI 10 е.а./мкл — 5 мкл;
- рестриктаза AscI 10 е.а./мкл — 5 мкл;
- вода — 3 мкл.

Рестриксию проводили 5 часов при 37 °С.

После обработки рестриктазами к вектору добавляли щелочную фосфатазу из кишечника теленка (CIAP, Fermentas), которая катализирует удаление фосфатных групп с 5'-конца, это необходимо для предотвращения лигирования молекулы самой на себя.

В реакции обработки щелочной фосфатазой использовали следующие компоненты:

- вектор после рестрикции — 5 мкл;
- буфер для CIAP 10× (Fermentas) — 5 мкл;
- CIAP — 1 мкл;
- вода — 31 мкл.

После обработки рестриктазами и фосфатазой продукты были очищены с использованием набора GeneJET™ PCR Purification Kit (Fermentas).

Полученные в результате рестрикции фрагменты использовали в реакции лигирования с различным соотношением вектора и вставки.

## **2.6. Мутагенез на основе плазмиды с геном десмина**

Для мутагенеза использовали праймеры длиной около 40 п.н. для достижения высокой точности и специфичности. Праймеры подбирали с использованием калькулятора для олигонуклеотидов <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/> и были сконструированы таким образом, чтобы искомая замена находилась в середине праймера. Основными критериями для выбора праймеров служили: процентное содержание гуанина и цитозина > 60%, преобладание гуанина и цитозина на флангах праймера, минимальное количество вторичных структур, таких как шпильки, димеры. В Таблице 4 приведены последовательности праймеров, используемых для мутагенеза, а также замены аминокислот, которые вызывают соответствующие мутации.



Таблица 4 — Последовательности праймеров, используемых для мутагенеза и замены аминокислот, вызывающие соответствующие мутации в гене *DES*

Название праймера	Последовательность праймеров
mDes S12F Fw	5'- GCG TGT TCT CCT ACC GCC GCA CCT TCG GCG GCG CCC CG -3'
mDes S12F Rv	5'- CGG GGC GCC GCC GAA GGT GCG GCG GTA GGA GAA CAC GC -3'
mDes A213V Fw	5'- TGG CTG CCT TCC GAG TGG ATG TGG ATG CAG CC -3'
mDes A213V Rv	5'- GGC TGC ATC CAC ATC CAC TCG GAA GGC AGC CA -3'
mDes L345P Fw	5'- CCT CAA GGG CAC CAA CGA CTC CCC GAT GAG GCA GAT GAG GG -3'
mDes L345P Rv	5'- CCC TCA TCT GCC TCA TCG GGG AGT CGT TGG TGC CCT TGA GG -3'
mDes A357P Fw	5'- GGA GCT GGA GGA TCG CTT TCC CAG CGA GGC CAA TGG CTA TCA GG -3'
mDes A357P Rv	5'- CCT GAT AGC CAT TGG CCT CGC TGG GAA AGC GAT CCT CCA GCT CC -3'
mDes L370P Fw	5'- CAA CAT TGC GCG CCC GGA GGA GGA GAT CCG -3'
mDes L370P Rv	5'- CGG ATC TCC TCC TCC GGG CGC GCA ATG TTG -3'
mDes D399Y Fw	5'- GAT GGC CTT GTA TGT GGA GAT CGC CAC CTA CCG GAA GCT ACT GGA-3'
mDes D399Y R	5'- TCC AGT AGC TTC CGG TAG GTG GCG ATC TCC ACA TAC AAG GCC ATC -3'

Для контроля эффективности клонирования и мутагенеза использовали клетки линии 293T, которые в норме не экспрессируют десмин. Положительное иммуноцитохимическое окрашивание клеток являлось доказательством прохождения трансфекции, сборки вирусных частиц и экспрессии белка интереса (Рисунок 2). Для контроля прохождения ко-трансфекции и сборки вирусных частиц ставили дополнительный эксперимент ко-трансфекции клеток экспрессионной плазмидой, имеющей в составе зеленый флуоресцентный белок (GFP). На следующий после трансфекции день клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида (ПФА) десять минут при +4 °C и оценивали зеленый сигнал на флуоресцентном микроскопе.

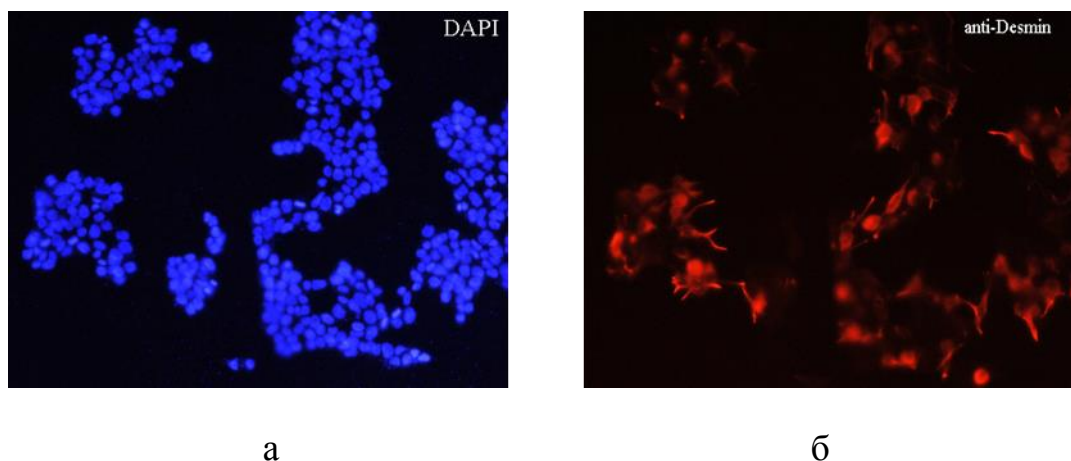


Рисунок 2 — Окрашивание трансдуцированных клеток линии 293Т(×20) при помощи DAPI (а) и антител против десмина (б)

### 2.7. Продукция лентивирусных конструкций, содержащих ген десмина

На следующий день после реакции трансформации продуцирующих бактерий *E. coli* смесью, полученной в результате лигирования, проводился отбор выросших клонов и выделение плазмидной ДНК, которую затем проверяли контрольной рестрикцией с помощью SpeI и AscI, а также полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием cAscIFw и cSpeIRv праймеров. В ходе рестрикции получили фрагменты ожидаемой длины 10292 п.н. и 1460 п.н.

Вектор pLVTHM является экспрессионным вектором лентивирусной системы. При ко-трансфекции экспрессионного вектора и векторов, кодирующих белки оболочки вирусной частицы (pMD2) и белки, ответственные за упаковку частиц (psPAX2), в модифицированных клетках эмбриональной почки человека линии 293Т инициируется сборка лентивирусов. Ко-трансфекцию проводили при помощи агента липофектамина в соответствии с рекомендациями производителя (Lipofectamine 2000, Invitrogen, США). Кондиционированную среду, содержащую лентивирусы, в дальнейшем использовали для трансдукции клеток интереса. Для увеличения эффективности заражения кондиционированную среду концентрировали при помощи ультрацентрифугирования.

## 2.8. Получение индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) и их дифференцировка в кардиогенном направлении

В качестве клеточного источника для репрограммирования и получения иПСК линий использовались мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) подкожной жировой ткани пациента, несущего мутацию в гене десмина NM\_001927:c.735+1G>A. ММСК трансдуцировали вирусами Сендай, несущими гены *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *CMYC* (CytoTune iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit). Преимуществом данного подхода является отсутствие интеграции трансгенов в геном клетки и кратковременное существование вирусной РНК в репрограммируемой клетке. Маркером успешного репрограммирования являлась эндогенная экспрессия транскрипционных факторов *OCT3/4*, *SOX2*, *CMYC*, *NANOG* и поверхностных антигенов TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4, подтвержденная методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Помимо этого, плюрипотентность линий иПСК (контрольной линии и линии от пациента с кардиомиопатией) была подтверждена *in vivo* при помощи анализа тератом, сформировавшихся в результате инъекции иПСК иммунодефицитным мышам линии Nude и *in vitro* при помощи анализа экспрессии тканеспецифичных генов в эмбриоидных телах, сформированных из иПСК. Все полученные линии иПСК были охарактеризованы с позиции структурной целостности хромосом методом сравнительной геномной гибридизации (array-CGH) и методом стандартного кариотипирования. В качестве контрольных линий использовались иПСК, полученные из ММСК здоровых доноров. От пациента и от здоровых доноров было получено и забанкировано по 3–7 линий иПСК. Полученные колонии иПСК были изолированы и прокультивированы в течение 10–15 пассажей, после чего кардиогенная дифференцировка иПСК проводилась согласно ранее опубликованному протоколу Р. BurrIDGE [87] с модификациями в виде метаболической селекции и гипоксических условий культивирования в течение трех недель. Маркерами успешной дифференцировки считались спонтанные сокращения эмбриоидных тел и экспрессия транскрипционных факторов GATA4 и

MEF2C, а также белков саркомера: тяжелой (MYH7) и легкой цепей миозина (MYH6), сердечной изоформы тропонина Т (TNN2), тропомиозина (TPM1),  $\alpha$ -актинина (ACTN2), десмина (DES).

## 2.9. Получение первичной культуры мышечных клеток мыши

Эксперименты проводили на иммортализованных мышечных миобластах линии C2C12 и первичных миотрубках, образованных из сателлитных мышечных клеток мыши. Для выделения сателлитных клеток и миофибрилл использовали мышей-самцов линии C57BL/6 в возрасте 8–12 недель. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации. Для получения миофибрилл использовали *m. flexor digitorum brevis*. Выделенные мышцы помещали в среду DMEM с антибиотиком и 0,3% раствором коллагеназы I типа (Sigma Aldrich, США) при температуре +37 °C в течение 3 часов с последующей отмывкой в среде DMEM с добавлением 20% телячьей сыворотки (FCS). Измельчение мышц и выделение отдельных мышечных волокон проводили в среде DMEM в присутствии концентрированной вирусной суспензии. Выделенные миофибриллы помещали в лунки шестилуночных микротитровальных планшетов (Corning, США), покрытых матриксом Geltrex (Beckton Dikens, США) для лучшей адгезии клеток. Клетки культивировали в среде DMEM с 20% FCS. Для подтверждения миогенной природы выделенных клеток проводили иммуноцитохимическое окрашивание антителами к десмину (как описано в разделе 2.12) (Рисунок 3).

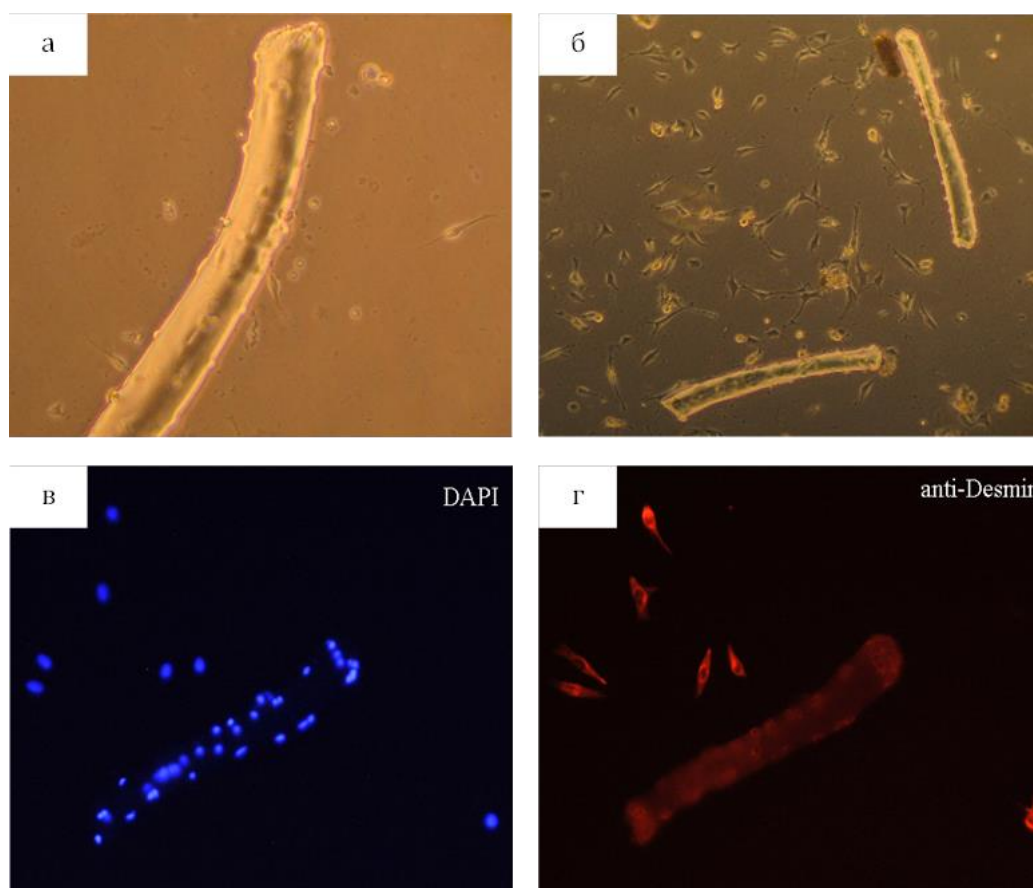


Рисунок 3 — Миофибрилла и первичные сателлитные клетки через 24 часа после выделения (а), через 72 часа после выделения (б); Иммуноцитохимическое окрашивание миофибрилл и сателлитных клеток DAPI (в) и антителами против десмина (г)

## 2.10. Культивирование клеток линии C2C12 и миогенная дифференцировка сателлитных клеток и клеток линии C2C12

Клетки линии C2C12 культивировали в среде DMEM (Invitrogen, США), с добавлением 10% FCS, 1% L-глутамин (Invitrogen, США) и 1% пенициллин-стрептомицина (Invitrogen, США) в термостате при 37 °С, 5% CO<sub>2</sub> и 99% влажности. Культуральную среду меняли каждые двое суток. При достижении клетками монослоя проводили пересев культуры, для этого удаляли культуральную среду и промывали клетки фосфатным буфером. Для открепления

клеток со дна культуральной посуды использовали 2,5-кратный раствор трипсина (Invitrogen, США), разведенный в фосфатном буфере. Клетки инкубировали с трипсином в термостате в течение 3–5 мин. Затем добавляли прогретую до 37 °С культуральную среду и тщательно ресуспензировали, разбивая клеточные агрегаты. Для подсчета количества клеток использовали камеру Горяева. Для этого 15 мкл клеточной суспензии помещали в камеру и производили подсчет клеток под микроскопом.

После определения концентрации клеток клеточную суспензию центрифугировали при 300 g в течение 5 мин, удаляли надосадочную жидкость и ресуспензировали клеточный осадок в 10% растворе криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) из расчета 1 млн клеток в 1 мл раствора. Суспензию клеток переносили в криопробирки и замораживали при температуре –80 °С. На следующий день криопробирки переносили в жидкий азот (–195 °С) для последующего длительного хранения.

Индукцию миогенной дифференцировки клеток производили путем замены культуральной среды на дифференцировочную среду (DMEM) с добавлением 2% лошадиной сыворотки, 1% L-глутамин (Invitrogen, США). Перед сменой среды клетки промывали прогретым до 37 °С фосфатным буфером и дифференцировали в течение 24 ч или семи дней.

### **2.11. Трансдукция первичных миофибрилл мыши и клеток линии C2C12 лентивирусными конструкциями**

Кондиционированную среду, содержащую лентивирусы, собирали через 40 и 64 часа после ко-трансфекции. Вирусную суспензию центрифугировали 5 мин при 300 g, затем надосадочную жидкость фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Для увеличения эффективности трансдукции вирусную суспензию концентрировали ультрацентрифугированием в течение двух часов при 70 000 g при +4 °С. Полученные лентивирусы использовали для трансдукции первичных миофибрилл мыши и клеток линии C2C12. Через 64 часа после

трансдукции ее эффективность оценивали на флуоресцентном микроскопе и проточном цитофлюориметре по свечению GFP.

Через 3–4 суток после трансдукции в культуре сателлитных клеток индуцировали дифференцировку и образование миотрубок путем культивирования в среде с низким содержанием сыворотки, для этого 20% эмбриональную телячью сыворотку (FCS) в среде для культивирования заменяли на 2% лошадиную сыворотку. Последующие эксперименты с регистрацией внутриклеточных кальциевых токов, оценкой функции дыхания и синтеза АТФ проводили на культуре миотрубок.

Клетки линии C2C12 были также трансдуцированы концентратом вирусных частиц (мультипликация инфекции (MOI) = 5), через 16 ч после трансдукции проводили смену культуральной среды.

## **2.12. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток**

Для оценки морфологии мышечных клеток использовали методы иммуноцитохимического окрашивания. Клетки фиксировали холодным 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин при температуре 4 °С и пермеабелизовали 0,05% раствором тритона X-100 в фосфатном буфере, неспецифическое окрашивание эпителиальных клеток блокировали с помощью 15% раствора FCS в течение 30 мин при комнатной температуре. Для специфического окрашивания применяли следующие первичные антитела: моноклональные мышечные антитела к ламину LMNA/C (Novocastra, Германия), моноклональные мышечные антитела к десмину D33 (DAKO, Дания), моноклональные мышечные антитела к тяжелым цепям миозина MF20 (R&D, США), моноклональные мышечные антитела к миогенину MAB6686 (R&D, США) и моноклональные кроличьи антитела к риадиноловому рецептору 1 D4E1 (Cell signaling, США). В качестве вторичных антител использовали AlexaFluor 488 или AlexaFluor 546 (Invitrogen, США). Клетки дополнительно окрашивали DAPI в течение 30 с. Микроскопию проводили на микроскопе Axio Observer (Zeiss, Германия), для

обработки и анализа изображений использовали программу AxioVision (Zeiss, Германия).

### 2.13. ПЦР в реальном времени для определения экспрессии миогенных маркеров

Из клеток линии C2C12, дифференцированных в миогенном направлении, выделяли РНК с помощью стандартного протокола выделения РНК тризолом (Trizol Reagent, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием обратной транскриптазы MMLV 50000 и рандомных (случайных) праймеров (Евроген, Россия). Реакцию ПЦР в реальном времени осуществляли на приборе 7500 Real-TimePCRSystem (LifeTechnologies, США). Последовательности используемых праймеров представлены в Таблице 5. Для анализа данных был использован  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  метод с нормализацией на экспрессию внутреннего контрольного гена (*GAPDH*). Для каждого варианта гена (LMNA/C WT, LMNA/C G232E, LMNA/C R571S) было сделано шесть биологических повторов, для каждого биологического повтора было сделано два технических повтора.

Таблица 5 — Последовательности праймеров, используемых для ОТ-ПЦР и определения экспрессии маркеров миогенной дифференцировки

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
Six1	ATGCTGCCGTCGTTTGGTT	CCTTGAGCACGCTCTCGTT
Pax3	CGATGGCATCCTGAGTGAGC	GCCGTGAAGGTGGTTCTGC
Myf5	AAGGCTCCTGTATCCCCTCAC	TGACCTTCTTCAGGCGTCTAC
Myomaker	CCTGTGATGGGCCTGGTTTGTC	GGTTCATCAAAGTCGGCCAGTGC
MyoD1	CTGCCTTCTACGCACCTGGAC	GGGCCGCTGTAATCCATCATGC
MyoG	GAGACATCCCCCTATTTCTAC	GCTCAGTCCGCTCATAGCC
Myh4	GGCTGAGGAGGCTGAGGAAC	CTTCTCCACCACCTCCTCCAC
Mrf4	CAGTGGCCAAGTGTTTCGGAT	CTTCTCCACCACCTCCTCCAC
GAPDH	GGATCTGACGTGCCGCCTG	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT



## **2.14. Оценка внутримитохондриального уровня кальция**

### **2.14.1. Применение флуоресцентных красителей и стимуляция митохондриального захвата кальция**

Внутримитохондриальный уровень кальция оценивали методом конфокальной микроскопии при помощи флуоресцентных кальций-чувствительных флюорофоров. Исследования проводили в культуре дифференцированных миотрубок, способных отвечать на электрическую и химическую стимуляцию высвобождением саркоплазматического пула кальция. Для детекции внутримитохондриального уровня кальция ( $[Ca^{2+}]_{mit}$ ) использовали краситель Rhod-2 AM (Molecular Probes, США). Для детекции цитоплазматического уровня кальция использовали флуоресцентный краситель ( $[Ca^{2+}]_i$ ) fluo-3 AM (Molecular Probes, США). Культуры клеток инкубировали при 37 °C в течение 30 минут в растворе 5 мкМ rhod-2 AM и 2 мкМ fluo-3 AM, затем в течение 20 минут промывали в растворе Тирота. В качестве деполяризующего агента использовали разбавитель FCCP (Sigma, Германия) в концентрации 0,2 мкМ в течение 5 минут. Стимуляцию митохондриального захвата кальция проводили электрическим током с частотой 1 Гц, 10 Гц и 100 Гц, а также хлор-М-крезолом.

### **2.14.2. Конфокальная лазерная микроскопия**

Конфокальную микроскопию в режиме реального времени проводили с использованием установки BioRad MRC 1024 (BioRad Microscopy Division, Hertfordshire, Англия) с двойным лазером (Cobolt, Solna, Швеция) и инвертированного микроскопа Nikon Diaphot 200. Для большинства измерений использовали объектив Nikon Plan Apo 20x (N.A. 0,75). Регистрацию флуоресцентного сигнала от rhod-2 AM проводили при длине волны возбуждения 531 нм и длине эмиссионной волны 585 нм. Регистрацию

флюоресцентного сигнала от fluo-3AM проводили при длине волны возбуждения 491 нм и длине эмиссионной волны 515 нм. Регистрацию изображения проводили каждые 7 секунд, для каждого эксперимента регистрировали 42 изображения для последующего анализа. Видеоизображения анализировали с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья НИИ, США). Для определения средней интенсивности митохондриального сигнала учитывали степень флюоресценции красителя rhod-2 в периядерной зоне, богатой митохондриями. В качестве неспецифического фона учитывали уровень флюоресценции вне митотрубок. Интенсивность сигнала от флюоресцентных красителей выражали как соотношение  $F/F_0$ , где  $F$  — интенсивность сигнала после стимуляции и нормализации на фон, а  $F_0$  — интенсивность сигнала до стимуляции после нормализации на фон. Таким образом, в зависимости от применяемого флюорофора, соотношение  $F/F_0$  отражало степень увеличения концентрации внутримитохондриального и цитозольного кальция в процессе эксперимента.

### **2.15. Исследование функции клеточного дыхания в культуре клеток с использованием прибора «Sea horse»**

Первичные сателлитные клетки были посеяны на поставляемый к прибору «Sea horse» (Agilent, США) 96-луночный микротитровальный планшет, клетки культивировали в 80 мкл культуральной среды до достижения конfluence. После этого индуцировали миогенную дифференцировку согласно протоколу, описанному в разделе 2.10, в течение семи дней. Каждый клеточный тип (незараженные клетки, клетки, несущие десмин дикого типа или мутантные формы десмина) был посеян по меньшей мере в 14 лунок.

Перед началом детекции культуральную среду перемешивали в течение десяти минут, между последующими тремя временными точками культуральную среду перемешивали три минуты. На первом этапе измеряли базальный уровень потребления кислорода, т. н. базовое дыхание, после чего в систему добавляли олигомицин. Олигомицин является ингибитором АТФ-азы, в результате продукция

АТФ митохондриями прекращается, мембранный потенциал остается неизменным и потребление кислорода снижается до уровня немитохондриального дыхания. После измерения немитохондриального дыхания в систему добавляли FCCP. Применение FCCP необходимо для измерения максимального дыхания. FCCP, будучи ионофором, усиливает неселективный транспорт протонов через мембрану, меняет митохондриальный мембранный потенциал и вызывает разобщение окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ. Вследствие воздействия FCCP снижается тормозящее действие протонного градиента на ферменты дыхательной цепи, и достигается максимальный уровень дыхания. На следующем этапе измерений в систему добавляется антимицин — ингибитор комплекса III дыхательной цепи. Его применение вызывает снижение потребления молекулярного кислорода и тормозит митохондриальный синтез АТФ.

## **2.16. Исследование функции потенциалзависимого натриевого канала (Nav1.5) с помощью методики локальной фиксации мембранного потенциала**

Регистрация входящих натриевых токов проводилась с помощью метода локальной фиксации потенциала в отведении от целой клетки. Для подтверждения того, что исследуемые биофизические характеристики относятся к потенциалзависимым натриевым каналам (Nav1.5) были проведены эксперименты с блокированием токов при помощи производных тетродотоксина. Вольт-амперные характеристики ( $I/V$ ) получались путем деполяризации клетки от поддерживаемого потенциала  $-100$  мВ. Плотность тока (рА/пФ) оценивалась путем деления амплитуды тока на емкость клетки и использовалась для построения графика отношения плотности тока и напряжения. Емкость клетки рассчитывалась с использованием емкостного тока, вызванного импульсом  $+5$  мВ от поддерживаемого потенциала. Потенциал реверсии рассчитывался путем линейной экстраполяции пиковых токов при положительных потенциалах деполяризации, зависимость активации от напряжения рассчитывалась из  $I/V$  протокола. Стационарная инактивация измерялась при помощи следующего протокола:

клетки находились при потенциале  $-100$  мВ, а затем были гипер- и деполяризованы в течение 500 мсек до напряжений между  $-120$  и  $0$  мВ с шагом  $5$  мВ.

### 2.17. Создание генетических конструкций, несущих мутации гена *LMNA*, для последующей модификации мезенхимных стволовых клеток

Клонирование кДНК гена *LMNA* из вектора pCDHblast MCSNard OST-LMNA (Addgene, США) в лентивирусный вектор pLVTHM осуществляли методом, описанным выше. Затем путем направленного сайт-специфического мутагенеза с использованием методов, описанных в разделе 2.6, и праймеров, указанных в Таблице 6, получили 6 генетических конструкций, несущих мутантные формы гена *LMNA*, со следующими точечными мутациями: G232E, G465D, R471C, R482L, R527C и R571C.

Таблица 6 — Последовательности праймеров, используемых для мутагенеза и замены аминокислот, вызывающие соответствующие мутации в гене *LMNA*

Название праймера	Последовательность праймера
G465D (F)	AAT GAG GAC CAG TCC ATG GAC AAT TGG CAG ATC AAG CGC
G465D (R)	GCG CTT GAT CTG CCA ATT GTC CAT GGA CTG GTC CTC ATT
R482L (F)	GAT CCC TTG CTG ACT TAC CTG TTC CCA CCA AAG TTC ACC
R482L (R)	GGT GAA CTT TGG TGG GAA CAG GTA AGT CAG CAA GGG ATC
G232E (F)	CTG GTG GAG ATT GAC AAT GAG AAG CAG CGT GAG TTT GAG
G232E (R)	CTC AAA CTC ACG CTG CTT CTC ATT GTC AAT CTC CAC CAG
R471C (F)	GGC AAT TGG CAG ATC AAG TGC CAG AAT GGA GAT GAT CCC
R471C (R)	GGG ATC ATC TCC ATT CTG GCA CTT GAT CTG CCA ATT GCC
R527C (F)	GGC TGC GGG AAC AGC CTG TGT ACG GCT CTC ATC AAC TTC
R527C (R)	GAA GTT GAT GAG AGC CGT ACA CAG GCT GTT CCC GCA GCC
R571H (F)	CCC GCT GAG TAC AAC CTG CAC TCG CGC ACC GTG CTG TGC
R571H (R)	GCA CAG CAC GGT GCG CGA GTG CAG GTT GTA CTC AGC GGG

## 2.18. Культивирование ММСК и их дифференцировка

В исследовании были использованы культуры ММСК 3–6 пассажа, полученные от здоровых доноров по методике, описанной ранее [117]. Клетки культивировали в пластиковых флаконах (Corning, США) в среде альфа-МЕМ (Биолот, Россия) с добавлением 10% FCS (Hyclone, США), 50 ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США) в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Для подтверждения принадлежности полученных культур к ММСК на проточном цитофлюориметре GuavaEasyCyte6 (Millipore, США) проводили иммунофенотипирование с использованием моноклональных антител против CD19, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 и CD166 (BD, США) по стандартной методике [117]. Адипоцитарную дифференцировку ММСК индуцировали добавлением к стандартной среде для культивирования 0,5 мМ изобутилметилксантина (IBMX; Sigma, США), 1 мкМ дексаметазона (Sigma, США) и 5 мкг/мл инсулина (Sigma, США). Для остеогенной дифференцировки к стандартной среде для культивирования добавляли следующие факторы: 50 мкМ аскорбиновой кислоты, 1 мкМ дексаметазона и 10 мМ бета-глицерофосфата (Sigma, США).

## 2.19. Подсчет эффективности дифференцировки

В экспериментах использовали интактные клетки, трансдуцированные контрольным вирусом, несущим ген ламина дикого типа (LMNAWT), либо ламина с одной из 6 исследуемых мутаций. В трансдуцированных и контрольных клетках индуцировали адипогенную и остеогенную дифференцировки и оценивали их эффективность с помощью анализа массива микрофотографий и оценки экспрессии специфических маркеров дифференцировки. Анализ массива микрофотографий проводили на культурах, полученных через 21 день после индукции дифференцировки. Клетки после адипогенной дифференцировки окрашивали суданом красным (Oil Red, Sigma, США), а после остеогенной

дифференцировки — ализариновым красным (Sigma, США). Микрофотографии получали с помощью микроскопа «Аксио Обсервер» с объективом LD «A-Plan» 20X/0.3 Ph (Carl Zeiss, Германия) и камеры Camera Jenoptic ProgRes MF (Jenoptic, Германия). Затем проводили анализ массива микрофотографий с обчетом соотношения областей дифференцированных и недифференцированных клеток с помощью системы MosaiX (Carl Zeiss Microsystems, Германия).

## **2.20. Определение колониобразующей способности ММСК методом предельных разведений**

Оценку колониобразующих единиц (КОЕ) в популяции ММСК после трансдукции лентивирусными конструкциями проводили на третьем пассаже по следующей методике: клеточные суспензии последовательно разбавляли в 2 раза в каждой из 8 лунок, в 96-луночных планшетах, в результате чего столбцы микротитровальных планшетов содержали от 50 до 0,39 клеток на лунку. Через 10 дней от начала культивирования для каждой концентрации клеток определяли количество положительных и отрицательных лунок по факту наличия колоний.

## **2.21. Анализ экспрессии остеогенных и адипогенных маркеров**

Оценку экспрессии маркеров проводили на 3-и, 7-е и 14-е сутки адипогенной дифференцировки и 4-е, 14-е, 21-е сутки остеогенной дифференцировки с помощью ПЦР в реальном времени. Для этого общую РНК выделяли с помощью реагента TRIzol® Reagent (Invitrogen, США). Реакцию обратной транскрипции проводили, используя набор реагентов RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Для количественного анализа изменения уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки использовали коммерческие системы ПЦР в реальном времени SYBR Green (Евроген, Россия). Для оценки уровня адипогенной дифференцировки использовали специфические маркеры: гамма-рецептор, активирующий пролиферацию пероксисом (PPARG), белок 1,

связывающий стерол-регулирующий элемент (SREBP1) и фактор D (адипсин). Для оценки уровня остеогенной дифференцировки использовали специфические маркеры: остеопонтин (*SPP1*), сиалопротеин (*IBSP*) и остеокальцин (*BGLAP*).

Последовательности праймеров для оценки экспрессии соответствующих генов представлены в Таблице 7.

Таблица 7 — Последовательности праймеров, используемых для ОТ-ПЦР с целью исследования экспрессии маркеров адипогенной и остеогенной дифференцировки

Название праймера	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
IBSP	TGCCACTCACTGCCTTGAGCC	GAGAAAGCACAGGCCATTCCCA
BGLAP	TGGCCGCACTTTGCATCGCT	TTGCTGGACTCTGCACCGCT
SPP1	GCCACATGGCTAAACCCTGACCC	TGTGGTCATGGCTTTCGTTGGACT
hPPAR <sub>g</sub>	AGCCTTCCAACCTCCCTCATGGCA	TCCGGAAGAAACCCTTGCATCCT
SRBP1	TGAGGACAGCAAGGCAAA	GCCATCTCTGCTCTCGGT
CDF	CATGCTCGGCCCTACATGG	CACAGAGTCGTCATCCGTCAC
GAPDH	AATGAAGGGGTCATTGATGG	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA

## 2.22. Множественный анализ экспрессии генов

Для одновременной оценки экспрессии 84 специфических генов, связанных с адипогенной и остеогенной дифференцировкой ММСК, нами были использованы мультиплексные наборы для оценки остеогенеза и адипогенеза (SABiosciences, США). ПЦР в реальном времени выполняли на приборе 7500 Real-TimePCRSystem (LifeTechnologies, США) при следующих условиях: 10 мин при 95 °С, 15 сек при 95 °С и 1 мин при 60 °С. Для нормализации данных использовали пять генов эндогенного контроля: ген  $\beta$ -актина, ген  $\beta$ -2-микроглобулина, ген *GAPDH*, ген *HPRT1* и ген большой субъединицы рибосомы. Пороговые значения и критерии значимости были установлены в соответствии с инструкциями производителя (SABiosciences, США). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения, поставляемого компанией Qiagen:

<http://www.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. Суммарное изменение экспрессии генов (по сравнению с диким типом) было рассчитано с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$ . Ген считали дифференциально экспрессирующимся, если уровень его экспрессии менялся более чем в 1,5 раза по сравнению с уровнем экспрессии гена дикого типа ( $p < 0,01$ ). Для анализа дифференциальной экспрессии и проведения иерархической кластеризации использовали программное обеспечение dChip 2008 (Cheng Li Lab, Boston, MA). Все эксперименты проводили в трех биологических повторах, т. е. в трех независимых экспериментальных процедурах.

### **2.23. Вестерн-блоттинг с применением антител к ламину A/C и оценка общей активности гистоновых деацетилаз**

Для исследования влияния мутаций гена ламина на уровень экспрессии дифференцировочных маркеров, ММСК трансдуцировали одновременно конструкциями, несущими одну из мутантных форм ламина и ген дикого типа. Клетки культивировали 4 дня по методике, описанной в п. 0, затем лизировали и подтверждали содержание белка ламина A/C методом иммуноблоттинга по стандартной методике с использованием моноклональных мышинных антител к белку ламину A/C (Novocastra, Германия). Для детекции сигнала использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (BioRad). Детекцию осуществляли с помощью системы усиленной хемилюминесценции (Thermo Scientific, США) согласно инструкции производителя на приборе ChemiDoc (BioRad, США).

Общую активность гистоновых деацетилаз (HDAC) измеряли флюориметрическим методом с помощью набора Fluor-de-Lys-green (Enzo Life Sciences, США) в соответствии с инструкциями производителя. Детекцию сигнала проводили с применением прибора BioTeck Synergy.



## 2.24. Конструирование вектора и мутагенез мутантных форм гена *TNNI3*

Клонирование кДНК кодирующей части гена сердечного тропонина I (*TNNI3*, NM\_000363.4) производилось в плазмиду pET3C. Направленный мутагенез производили при помощи ПЦР с использованием праймеров длиной около 40 п.н., содержащих в последовательности необходимые нуклеотидные замены (Таблица 8). ПЦР проводили в объеме 25 мкл с использованием полимеразы Pfu (NEB, США), 300 мкМ dNTP, 150 нг матричной плазмиды, 0,5 пМ каждого праймера.

Реакцию проводили при следующих условиях:

- денатурация цепей ДНК — 30 секунд при 95 °С;
- денатурация цепей ДНК — 30 секунд при 95 °С;
- отжиг праймеров — 1 минута при 55 °С;
- элонгация цепи — 18 минут при 72 °С;
- предыдущие три шага повторяли 14 раз;

Полученные продукты ПЦР обрабатывали 2 ед. фермента DpnI fast digest (Fermentas, Литва) в течение 20 минут при 37 °С для удаления следов плазмиды, после чего продукты ПЦР использовали для трансформации компетентных клеток линии *E. coli* Top10. Бактериальные клетки культивировали в течение ночи на твердой среде в присутствии ампициллина. Выросшие колонии использовали для клонального посева, выделения ДНК с помощью колонок MiniPrep (Invitrogen, США) и последующего секвенирования для проверки успешности мутагенеза.

Таблица 8 — Праймеры для мутагенеза и замены аминокислот, вызывающие соответствующие мутации в гене *TNNI3*

cTnI-R170G Fw:	GGC TAA GGA GTC CCT GGA CCT GGG GGC CCA CCT CAA GCA GG
cTnI-R170G Rv:	CCT GCT TGA GGT GGG CCC CCA GGT CCA GGG ACT CCT TAG CC
cTnIR170W Fw:	GGC TAA GGA GTC CCT GGA CCT GTG GGC CCA CCT CAA GCA GG
cTnIR170W Rv:	CCT GCT TGA GGT GGG CCC ACA GGT CCA GGG ACT CCT TAG CC

Для получения кДНК N-терминального фрагмента сердечной формы миозин-связывающего белка С (МВРС3 C0–C2) РНК изолировали из образца биопсии миокарда левого желудочка человека с использованием ReliaPrep™ RNA Miniprepssystem (Promega, США). Затем проводили одноступенчатую реакцию обратной транскрипции и амплификации с помощью набора реагентов One-step RT-PCR Kit (Quiagen, США). Фрагмент кДНК MyBPC был клонирован в вектор His-Tag pet28c.

## 2.25. Выделение белка для исследований *in vitro*

Актин и тропомиозин выделяли из высушенного белкового экстракта миокарда свиней в соответствии с известными протоколами [307, 370]. Коротко, актин выделяли из очищенного тканевого экстракта путем повторения нескольких циклов полимеризации/деполимеризации. Филаментозный актин (F-актин) получали путем полимеризации глобулярного актина (G-актина) в растворе 100 мМ KCl и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Тропомиозин получали хроматографически из высушенного ацетоном порошкового экстракта сердца свиньи с применением гидроксипатитных колонок. Выделение миозина проводили согласно известному протоколу [266], субфрагмент 1 миозина (миозин S1) выделяли путем ферментного расщепления миозина папаином и последующего удаления миозиновых фрагментов методом центрифугирования.

Субъединицы сердечных тропонинов человека и миозин-связывающего белка С C0–C2 получали рекомбинантным способом. Соответствующая последовательность ДНК была клонирована в вектор pET3c (TnI, TnC), pSBET (TnT) в соответствии с описанной ранее методикой [338] и в pET28a (MyBPC C0–C2). Экспрессию белка проводили в клетках *E. coli* линии BL21, после чего клетки лизировали и выделяли белок из клеточного лизата. TnT получали методом, описанным ранее [112] с использованием ионообменной колонки DE52 и последующей гель-фильтрации. Изолирование TnC проводили в соответствии с

методом, описанным ранее [68], с использованием этапа предочистки на DE52 ионообменной колонке и последующего этапа хроматографии с фенил-сефарозой. Тропонин I (TnI-WT, TnI-R170G и TnI-R170W формы) очищали с помощью ионообменной хроматографии на основе CM-сефарозы и TnC-покрытых аффинных колонок в соответствии с инструкцией производителя (GE Healthcare, США). Из отдельных субъединиц был восстановлен комплекс сердечных тропонинов человека, содержащий TnI-WT, -R170G, -R170W по методу, описанному ранее [68]. Субъединицы смешивали в эквимольных количествах в условиях денатурации, в присутствии 6 М мочевины и 0,5 М KCl и восстанавливали комплекс путем медленного снижения концентрации мочевины и KCl в ходе нескольких последовательных циклов диализа. Остаточные мономеры и димеры удаляли с помощью гель-фильтрации. Миозин-связывающий белок C (фрагмент MyBPC C0–C2) очищали с использованием Ni-магнитных частиц (Biotool/Selleckchem, США) в соответствии с инструкцией производителя.

## 2.26. Коседиментация

Для реконституции тонких филаментов F-актин, тропомиозин и тропонин I (субъединицы WT и R170G/W) смешивали в соотношении 7 мкМ актина : 1 мкМ тропомиозина : 1 мкМ тропонина и/или 1 мкМ MyBPC C0–C2 в конечном объеме 100 мкл в буфере для тонких филаментов, содержащем 20 мМ MOPS, pH 7,5, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ дитиотреитол (ДТТ), 10 мкМ этиленгликоль тетрауксусной кислоты (ЭГТА). Эту смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре и затем центрифугировали в течение 30 мин при 100 000 g и 4 °C. После удаления надосадочной жидкости осадок, содержащий тонкие филаменты, ресуспензировали в 100 мкл буфера. Белки надосадочной жидкости осаждали в 15% трихлоруксусной кислоте (ТХУ) центрифугированием. Осадок растворяли и анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Изображение фиксировали при помощи прибора Chemidoc MP System (Biorad, США) с последующим обчетом в программе ImageLab (Biorad, США). Долю TnI,

связанного с тонкими филаментами, определяли путем деления интенсивности бенда в составе осадка на общую интенсивность TnI, которую определяли как сумму интенсивности бендов в осадке и надосадочной жидкости. Для каждого эксперимента оценивали TnI-R170G/W +/- MyBPC C0-C2 в сравнении с контрольным тропонином дикого типа TnI-WT.

### **2.27. Поверхностный плазмонный резонанс**

Взаимодействие между нормальными и мутантными вариантами тропонина I и глобулярного актина и тропомиозина оценивали с помощью аппарата Biacore 2000 (GE Healthcare, США). Для коррекции на уровень неспецифического связывания параллельные измерения проводили в проточной ячейке, свободной от иммобилизованных лигандов. Диализ различных форм сердечного тропонина I (Tn-WT, Tn-R170G/W) проводили в HBS-EP+ буфере (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТА, 0,05% сурфактанта P20) после предварительной концентрации при помощи колонок Амикон до концентрации 30 мкМ. Кинетику ассоциации и диссоциации оценивали при шести различных концентрациях тропонина I (10 мкМ, 1 мкМ, 0,5 мкМ, 0,1 мкМ и 0,01 мкМ) и ложной инъекции при скорости потока 10 мкл/мин. Образцы оценивали в трипликатах в случайном порядке, и для каждой формы тропонина было проведено как минимум 3 повторных эксперимента. Восстановление поверхности чипа после каждого цикла проводили с помощью 2 M MgCl<sub>2</sub> в течение 1 минуты при скорости 50 мкл/мин. Полученные сенсограммы анализировали с использованием 1:1 модели связывания Лангмюра при помощи программного пакета BIAevaluation 3.1 для расчета уровня ассоциации и диссоциации, а также константы диссоциации K<sub>D</sub>.

## 2.28. Оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в восстановленном комплексе и силы сокращения изолированных миофибрилл

Тонкие филаменты восстанавливали из 8 мкМ свиного фибриллярного актина и 2 мкМ тропомиозина с 2 мкМ комплекса рекомбинантного человеческого тропонина I (сTnI-WT и R170G/W). После полного насыщения фибриллярного актина тропонином и тропомиозином филаменты подвергали диализу против буферного раствора, содержащего 20 мМ HEPES, pH 7,5, 70 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЭГТА, 2 мМ DTT. S1-фрагмент миозина получали путем диализа в буфере, содержащем 20 мМ MOPS, pH 7,5, 40 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ DTT. Филаменты, содержащие мутантные формы тропонина I, оценивали параллельно с филаментами, содержащими тропонин I дикого типа. Для определения активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в присутствии миозин-связывающего белка С филаменты инкубировали с MyBPC C0–C2.

Приготовление буферов с различной концентрацией ионов Ca<sup>2+</sup> и АТФ проводили в соответствии с опубликованным протоколом [282]. Для определения активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в присутствии миозин-связывающего белка С филаменты инкубировали с MyBPC C0–C2. Активность миозиновой-S1 АТФ-азы в присутствии тонких филаментов оценивали по степени гидролиза АТФ в ферментной системе MESG/PNP при различных концентрациях кальция при 20 °С и регистрировали фотометрически при длине волны 360 нм. Степень увеличения адсорбции рассчитывали для каждого варианта тропонина I при различной концентрации кальция, нормализовали к активности нерегулируемого фибриллярного актина и соотносили с концентрацией ионов Ca<sup>2+</sup>.

Изолированные сердечные миоциты получали путем гомогенизации миокарда 15-недельной морской свинки в обменном буфере после перфузии в фиксирующем буфере, не содержащем ионов кальция. После фильтрации и центрифугирования гомогената осадок ресуспензировали в перфорирующем буфере, содержащем 1% Triton X-100, 10 мМ Tris, 10 мМ NaCl, 150 мМ KCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, 1 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ ЭГТА, pH 7,1. После замещения тропонинового

комплекса на сердечный тропонин человека, степень замещения верифицировали с помощью метода Вестерн-блоттинга. Миоциты фиксировали в камере с помощью иглы и растягивали до 110% относительно длины в расслабленном состоянии. Силу сокращения регистрировали при различной концентрации ионов кальция, нормализовали на начальный и максимальный уровни и анализировали с помощью коэффициента Хилла [376].

## **2.29. Определение аллелей и генотипов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени**

Для изучения полиморфных вариантов rs2270915, rs2069542, rs45554236, rs753992, rs942077, rs35141404, rs7124958, rs2290149, rs10838692, rs140322345, rs202145133 ДНК выделялась из цельной крови с помощью набора для выделения ДНК FlexiGene (Thermo Scientific) с последующей оценкой качества и концентрации ДНК на спектрофотометре и путем электрофореза в акриламидном геле. Идентификация перечисленных полиморфных вариантов проводилась ОТ-ПЦР в режиме реального времени с помощью аллель-специфических праймеров фирмы Applied Biosystems (C\_\_15958985\_20, C\_\_1839843\_30, C\_\_86500233\_10, C\_\_11389250\_10, C\_\_1687563\_10, C\_\_11195441\_20, C\_\_29023019\_10, C\_\_22274738\_10, C\_\_1301094\_20, C\_161142889\_10, C\_190434020\_10) на амплификаторе Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System и набора реагентов фирмы «Евроген» (PK156L).

## **2.30. Статистическая обработка данных**

### **2.30.1. Статистическая обработка данных ПЦР в реальном времени**

Для статистической обработки данных ПЦР в реальном времени использовали программу *STATISTICA* 10 (StatSoft, Inc.) и GraphPad. В разведывательной и описательной частях статистического анализа применялись

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

### **2.30.2. Статистическая обработка данных генотипирования и сравнение частот единичных нуклеотидных полиморфизмов**

При оценке качественных переменных были построены таблицы сопряженности, содержащие как абсолютные, так и процентные данные о частотных распределениях в группах. Разницу в распределении аллельных вариантов между группами пациентов анализировали при помощи критерия соответствия Пирсона  $\chi^2$ . Если в некоторых ячейках таблицы сопряженности ожидаемая частота была менее 5, то использовался точный критерий Фишера. Достоверным считали значение  $p$  менее 0,05. Для выражения значимости выявленных ассоциаций между аллельными вариантами и фенотипом заболевания использовали значения отношения шансов (OR) и его доверительный интервал (95% CI). Коррекцию на множественные сравнения проводили при помощи FDR анализа.

### **2.30.3. Статистическая обработка данных расчета риска исхода ХСН с применением расчетных шкал**

Критерий Манна–Уитни применялся для проверки эффекта действия шкал калькуляторов риска в общей группе пациентов. Для сравнения попарного сравнения шкал на одной группе больных применялся критерий Вилкоксона, а при сравнении трех и более шкал одновременно — критерий Фридмана. Для продольного сравнения одной шкалы на одной и той же группе больных также применялся критерий Вилкоксона. ROC-анализ был использован для сравнения шкал калькуляторов риска между собой и определения их эффективности на общей группе пациентов. Для выделения ведущих предикторов в разделении пациентов на группы умерших и выживших был проведен дискриминантный анализ (ДА). Эффективность решающего правила, построенного по дискриминантной функции (ДФ), определялась по выборочной матрице классификации и F-критерию.



## **Глава 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ**

### **3.1. Описание исследуемой когорты пациентов**

Исследуемая когорта пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией включала 35 пациентов взрослой и детской группы, поскольку включение пациентов проходило вне зависимости от возраста дебюта заболевания (Таблица 9). В более чем половине случаев (22 пациента, 63%) заболевание дебютировало в возрасте до 18 лет, таким образом более половины исследуемой когорты на момент появления первых симптомов заболевания (ХСН и/или нарушения ритма) составляли пациенты детского возраста. В девяти случаях первые признаки заболевания проявились в возрасте до 3 лет, а в 14 случаях — до 5 лет. В 34% случаев отмечался семейный характер заболевания. Важно отметить, что у ряда пациентов отмечалась трансформация рестриктивного фенотипа в дилатационный или гипертрофический в течение времени, явления НЛЖ, а также трансформация гипертрофического фенотипа в рестриктивный — так называемая ундулирующая кардиомиопатия. Данный феномен, а также сочетание РКМП с врожденными пороками сердца, такими как ДМПП, ДМЖП и ОАП, наиболее часто наблюдался в группе пациентов с дебютом до 18 лет, встречаясь у 40% обследованных пациентов. Сходный феномен наблюдался и в семейных случаях заболевания и проявлялся сочетанием разных фенотипических форм КМП (рестриктивной, гипертрофической, дилатационной) у членов одной семьи, несущих одинаковую генетическую мутацию. Среди 12 случаев семейных форм заболевания, в 5 случаях заболевание у родственников пробанда проявлялось другими видами кардиомиопатии и структурных патологий сердца, нежели у пробанда (ГКМП, НЛЖ). У 10 (29%) из обследованных пациентов с идиопатической РКМП отмечались признаки нейромышечной патологии (Таблица 9). Пятерым пациентам была проведена трансплантация сердца, двое из которых имели дебют заболевания в возрасте до 18 лет.

Таблица 9 — Клиническая характеристика когорты пациентов с РКМП

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез РКМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
1	М	16	+	–	КФК ↑×1,2, признаки миопатии по данным ЭМГ	ФП (+4), LQTS	57	11	–	38	Смерть в возрасте 20 лет
2	Ж	45	+	–	–	ФП (+10)	61	10	65	0	Смерть в возрасте 58 лет
3	Ж	40	–	–	–	ФП (в дебюте)	63	10	–	7	Смерть в возрасте 42 лет (BC)
4	М	43	+	–	–	ФП (в дебюте)	59	9	59	2	Смерть в возрасте 45 лет
5	М	15	–	–	–	WPW, синдром короткого PQ	52 (z-score 5,2)	9	58	50	Смерть в возрасте 18 лет (BC)
6	Ж	30	+	ГКМП у матери	–	–	58	10	69	28	50 лет
7	Ж	12	+	Трансформация в ДКМП спустя 9 лет от дебюта РКМП, НЛЖ у матери	–	–	55 (z-score 6,09)	9	54	40	Трансплантация сердца в возрасте 23 лет
8	Ж	31	–	–	–	ФП (+4) AV блокада II степени, синусовая брадикардия	56	9	–	45	Трансплантация сердца в возрасте 38 лет

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез ГКМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
9	Ж	32	–	–	–	AV блокада II степени, SA блокада	59	11	71	47	Трансплантация сердца в возрасте 60 лет
10	Ж	22	–	Признаки гипертрабекулярности и НЛЖ	–	ФП (+4)	58	7	–	30	34 года
11	Ж	3	–	–	–	–	22 (z-score 3,2)	4 (z-score 0,56)	70	30	3 года
12	Ж	51	–	–	–	ФП (в дебюте) AV блокада, ЖТ, имплантация ИКД	64	9	–	42	Смерть в возрасте 55 лет
13	Ж	55	–	–	–	ФП (в дебюте)	61	12	–	54	Смерть в возрасте 56 лет
14	М	4	+	ДМПП, трансформация в ГКМП с рестриктивным фенотипом, ГКМП у отца	–	Суправентрикулярная тахикардия	23 (z-score 3,2)	4 (z-score 0,55)	72	32	Смерть в возрасте 6 лет (BC)

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез ГКМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
15	Ж	6	–	Трансформация в ГКМП с рестриктивным фенотипом	Гипотония, слабость мышц пояса нижних конечностей, дистопия тазобедренного сустава и артрогрипоз при рождении, КФК на верхней границе нормы, ЛДГ ↑×1,3		28 (z-score 3,8)	3,7 (z-score –0,2)	74	38	8 лет
16	Ж	3	–	–	Слабость мышц пояса нижних конечностей, мышечные атрофии, КФК на верхней границе нормы, ЛДГ ↑×1,1	Неполная блокада правой ножки п. Гиса	35 (z-score 4,89)	5,3 (z-score 1,3)	65	45	8 лет
17	М	28	+	ГКМП с рестриктивным фенотипом у сына	–	ФП (+22) AV блокада II степени, SA блокада	62	12	67	50	Смерть в возрасте 50 лет

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез ГКМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
18	М	11	–	–	Диффузная мышечная слабость, признаки миопатии по данным ЭМГ	ФП (+4), синдром слабости синусового узла, ЖТ, LQTS, имплантация ИКД	43 (z-score 4,45)	6,8 (z-score 0,8)	61	27	17 лет
19	М	15	–	Изначально фенотип ГКМП без клинической симптоматики, трансформация в РКМП в течение 8 лет	КФК ↑×1,5, признаки миопатии по данным ЭМГ, дистальная миопатия	AV блокада II степени, SA блокада, ЖТ, имплантация ИКД	56	9	59	43	Смерть в возрасте 33 лет
20	Ж	12	+	–	–	ФП (+8)	74	11	78	58	Смерть в возрасте 23 лет
21	Ж	8 месяцев	–	–	–	ФП (в дебюте), SA блокада	34 (z-score 5,5)	4,0 (z-score 0,47)	–	40	Смерть в возрасте 1,5 лет
22	М	8	–	–	Артрогрипоз, сколиоз, дистальная миопатия	ФП (+8)	42 (z-score 3,81)	9	62	41	Трансплантация сердца в возрасте 18 лет
23	М	1	+	ДМПП, ДМЖП	–	–	38 (z-score 5,01)	5,5 (z-score 1,08)	67	43	2 года
24	М	16	–	–	–	–	59	10	65	44	23 года

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез КМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
25	М	1	–	–	Артрогрипоз, сколиоз, слабость мышц пояса нижних конечностей, КФК ↑×1,2	–	40,7 (z-score 6,05)	5 (z-score 1,07)	69	37	Смерть в возрасте 3 лет
26	М	4	–	Открытый артериальный проток	ЛДГ ↑×1,1, мышечная кривошея	Транзиторный WPW феномен, неполная блокада правой ножки п. Гиса	49 (z-score 5,57)	7,5 (z-score 1,56)	60	40	11 лет
27	М	3	–	–	Аутизм, мышечная слабость, гипотония, признаки миопатии по данным ЭМГ	–	43 (z-score 5,8)	5 (z-score 0,58)	67	37	Смерть в возрасте 6 лет
28	М	2	+	ГКМП с рестриктивным фенотипом у отца	–	ФП (+1)	34 (z-score 4,2)	12,5 (z-score 2,3)	71	37	Смерть в возрасте 4 лет (ВС)
29	Ж	24	–	–	–	ФП (+20), желудочковая экстрасистолия высокой градации, ИКД	54	12	33	65	45 лет
30	Ж	1	–	Признаки НЛЖ, ДМШ	–	Наджелудочковая тахикардия	30,4 (z-score 4,16)	6,8 (z-score 1,8)	60	29	Смерть в возрасте 4 лет (ВС)

Пациент	Пол	Возраст дебюта заболевания	Семейный анамнез ГКМП	Фенотипическая трансформация или сопутствующий фенотип со стороны ССС	Нейромышечная симптоматика	Нарушения ритма (+лет от постановки диагноза)/имплантация ИКД	Размер ЛП, мм	ЗСЛЖ, мм	ФВ, %	Давление в ЛА, мм рт.ст.	Исход/возраст на момент последнего осмотра
31	Ж	2	–	ASD, PDA	Камптодактилия, ЛДГ $\uparrow \times 1,5$ , дистопия тазобедренного сустава	Неполная блокада правой ножки п. Гиса	43 (z-score 5,8)	6 (z-score 1,54)	63	33	6 лет
32	Ж	1	–	Признаки НЛЖ	–	Транзиторная АВ блокада I–II степени	46 (z-score 6,05)	6 (z-score 1,34)	55	85	10 лет
33	Ж	24	–	Трансформация в ГКМП с рестриктивным фенотипом	–	Полная блокада левой ножки п. Гиса	60	14	54	57	29 лет
34	Ж	1 месяц	+	ДМЖП, гипоплазия аорты	–	Суправентрикулярная тахикардия	60,5 (z-score 6,5)	8,6 (z-score 1,0)	45	75	14 лет
35	Ж	30	–	–	–	ФП, синдром Фридерика, кардиостимулятор	62	10	50	30	Трансплантация сердца в возрасте 47 лет

SA — синоатриальная, AV — атриовентрикулярная, ФП — фибрилляция предсердий, КФК — креатинфосфокиназа, ЭМГ — электромиография, ЖТ — желудочковая тахикардия, LQTS — синдром удлиненного интервала QT, ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, РКМП — рестриктивная кардиомиопатия, НЛЖ — некомпактный левый желудочек, ЛП — левое предсердие, ИКД — имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор, ЗСЛЖ — задняя стенка левого желудочка, ФВ — фракция выброса, ЛА — легочная артерия.

Средний возраст дебюта заболевания в обследуемой группе составил 12 лет [1 мес. — 55 лет], при этом среди пациентов детской группы с дебютом до 18 лет он составлял 3 года [1 мес. — 16 лет], а среди пациентов взрослой группы 31 год [22 года — 55 лет]. Для группы пациентов с признаками НМЗ возраст дебюта заболевания был меньше по сравнению с группой пациентов без признаков НМЗ (4 года [0,5 года — 32 года] и 19 лет [1 мес. — 55 лет],  $p = 0,0388$ , Рисунок 4а). При анализе длительности заболевания и его исходов в качестве конечных точек рассматривалась смерть пациентов от сердечно-сосудистых заболеваний или трансплантация сердца. Для пациентов с дебютом заболевания до 18 лет медиана возраста достижения конечной точки составила 11 лет [1,5 года — 33 лет], а для пациентов взрослой группы (дебют после 18 лет) 50 лет [38 лет — 60 лет] ( $p = 0,0001$ , Рисунок 4б). Продолжительность жизни после постановки диагноза для всех достигших конечной точки пациентов составила 2,4 года [1 год — 26 лет], при этом для пациентов детской группы она была меньшей и составляла 2,2 года [1 год — 18 лет], а для пациентов взрослой группы — 5,6 лет [1 год — 26 лет]. При отдельном анализе группы с дебютом заболевания в детском возрасте для пациентов с дебютом заболевания до 5 лет время достижения конечной точки составляло 2,0 [1,4–3,25] лет, а для пациентов с дебютом от 5 до 18 лет — 10,5 [1–18] лет ( $p = 0,05$ ; Рисунок 4в). Эта же тенденция сохранялась и при отдельном анализе всех пациентов по группам с дебютом до 5 лет и после 5 лет, соответственно, 2,0 [1,4–3,25] лет и 10 [1–27,25] лет ( $p = 0,029$ ; Рисунок 4г). При анализе влияния ФП на время достижения конечной точки нами было выявлено, что в группе пациентов с постоянной формой ФП оно составило 4,3 [1–26] лет, а в группе пациентов без постоянной формы ФП 2,9 [1–27,25] лет ( $p = 0,9$ ; Рисунок 4д). Время достижения конечной точки во взрослой группе было существенно ниже среди пациентов с дебютом заболевания с постоянной формой ФП по сравнению с группой пациентов без постоянной формы ФП в дебюте заболевания, соответственно, 2,1 [1–4] лет и 17 [7–27,25] лет ( $p = 0,014$ ; Рисунок 4е).



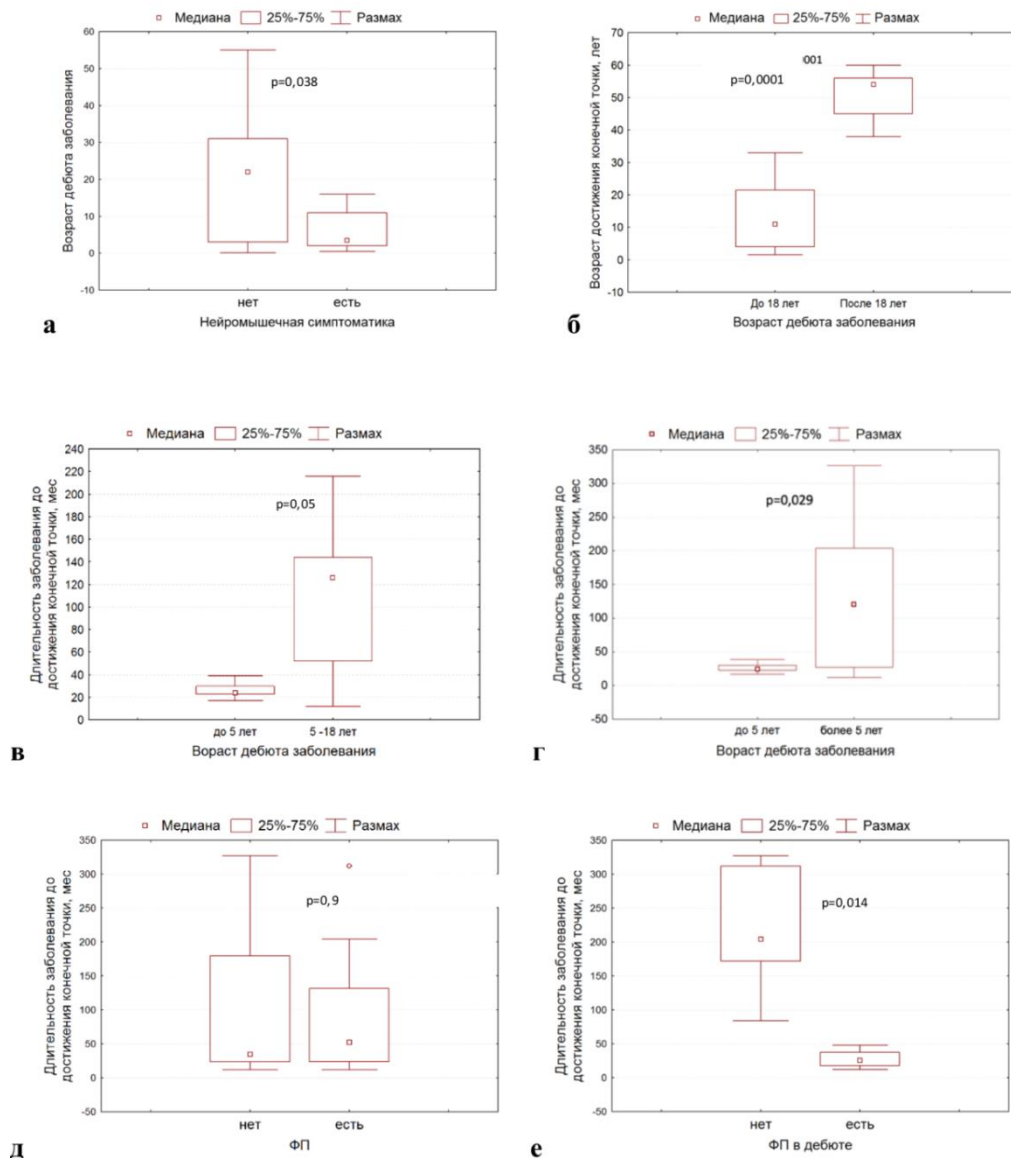


Рисунок 4 — Возраст дебюта и достижения конечной точки в различных группах пациентов с РКМП (в скобках приводится уровень значимости различия по критерию Манна–Уитни): (а) — возраст дебюта заболевания в зависимости от наличия нейромышечной симптоматики ( $p = 0,0388$ ); (б) — возраст достижения конечной точки в детской и взрослой группах ( $p = 0,0001$ ); (в) — длительность заболевания до достижения конечной точки в группах с дебютом заболевания до 5 лет и от 5 до 18 лет ( $n = 12$ ;  $p = 0,05$ ); (г) — то же в группах с дебютом заболевания до 5 лет и от 5 лет ( $n = 21$ ;  $p = 0,029$ ); (д) — то же в группах с фибрилляциями предсердий и без них за все время наблюдения ( $p = 0,65$ ); (е) — то же в группах с фибрилляциями предсердий в дебюте и без них ( $p = 0,02$ )

### 3.2. Анализ кривых выживаемости пациентов с РКМП

Сходные данные были получены и при анализе кривых выживаемости пациентов с РКМП различных групп при использовании в качестве конечной точки смерть пациентов от сердечно-сосудистых заболеваний или трансплантацию сердца (Таблица 9). Пятилетняя выживаемость без трансплантации в общей группе пациентов с РКМП составила 66,5%, а десятилетняя выживаемость — 52,5% (Рисунок 5а). Важно отметить, что примерно треть пациентов (27%) достигала конечной точки в первые три года после начала заболевания. При анализе спектра нарушений ритма и их влияния на выживаемость пациентов с РКМП нами было выявлено, что 5-летняя выживаемость с начала заболевания пациентов с РКМП и постоянной формой ФП составляла 54%, а в группе без ФП — 72% (Рисунок 5б). Наихудший прогноз наблюдается в группе пациентов, у которых дебют заболевания произошел с клиники постоянной формы ФП (Рисунок 5в). Однако необходимо отметить, что данная группа представлена только четырьмя пациентами и полученные данные требуют дальнейшего подтверждения на большей выборке пациентов.

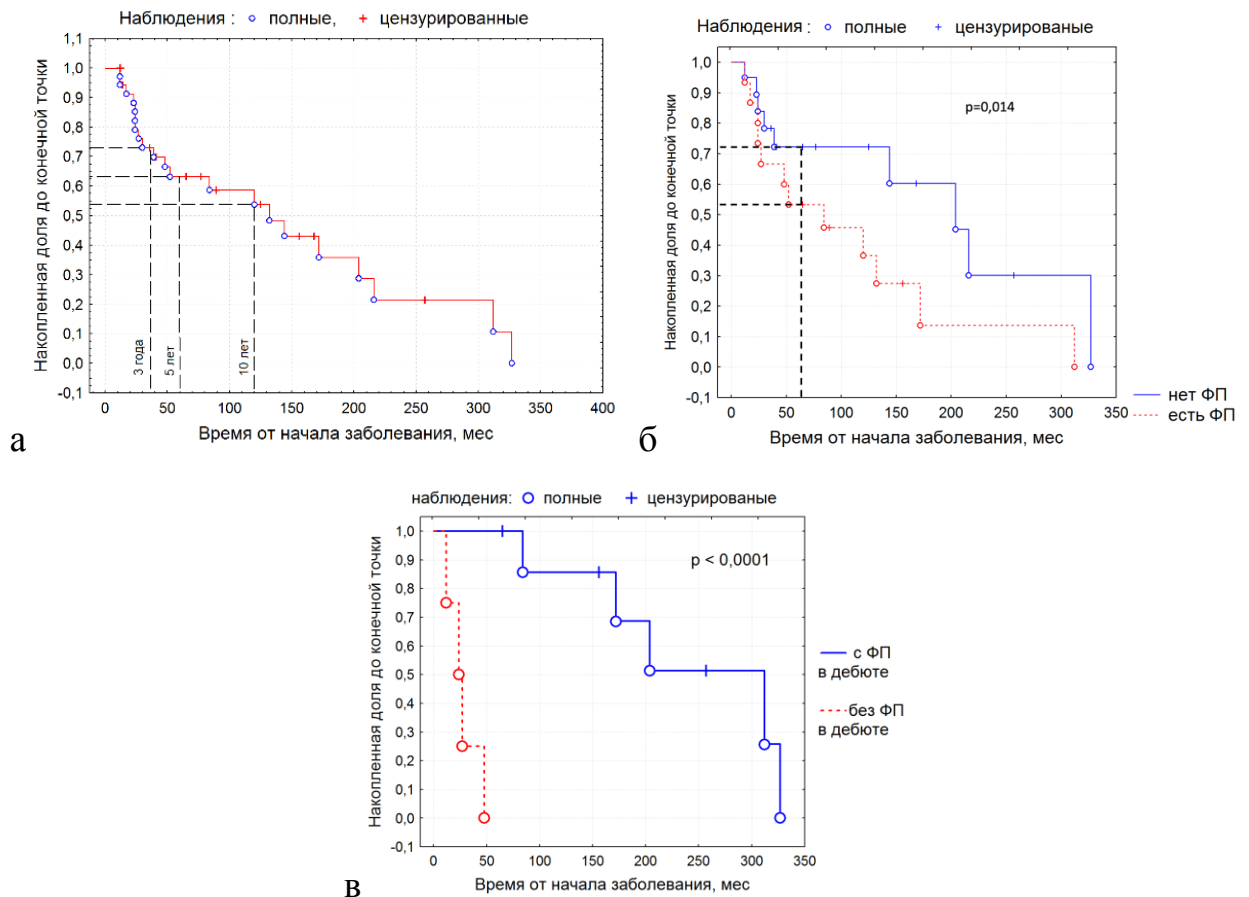


Рисунок 5 — Выживаемость пациентов с РКМП всех возрастных групп ( $n = 35$ ):  
 (а) — оценка общей кривой дожития; (б) — сравнение кривых дожития для пациентов с ФП и без ФП; (в) — сравнение кривых дожития для пациентов с дебютом с ФП и без такового

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

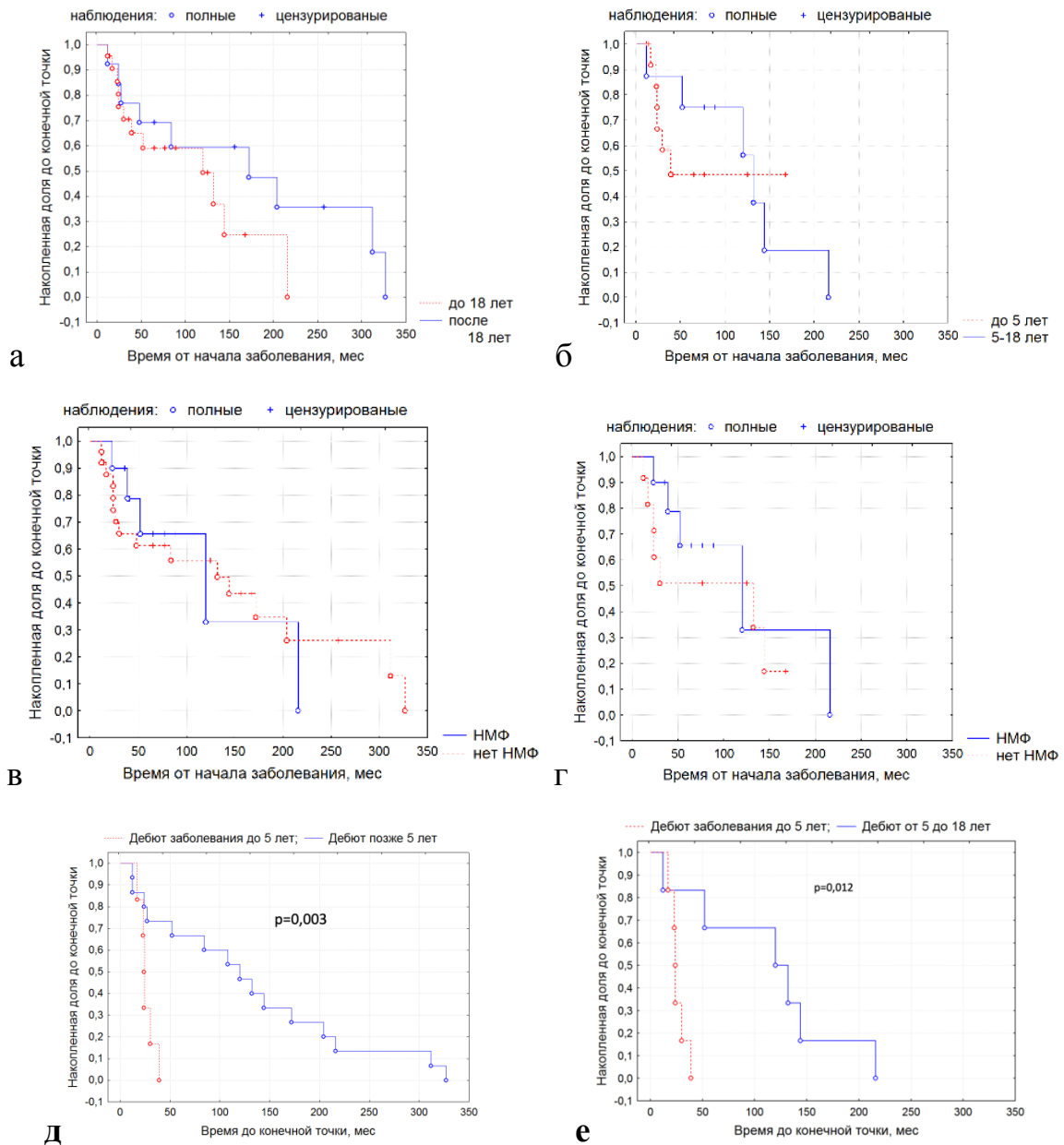


Рисунок 6 — Выживаемость пациентов с РКМП в зависимости от деления по следующим категориям:

- (а) — возраст дебюта заболевания до или после 18 лет; (б) — возраст дебюта заболевания до 5 лет или от 5 до 18 лет; (в) — наличие нейромышечного фенотипа (НМФ); (г) — наличие НМФ при дебюте заболевания до 18 лет; (д) — сравнение кривых Каплана–Мейера времени заболевания от манифестации до конечной точки для групп до и после 5 лет ( $n = 21$ ;  $p = 0,003$ , тест Кокса–Мантеля); (е) — сравнение кривых Каплана–Мейера времени заболевания от манифестации до конечной точки для групп до и после 5 лет только среди пациентов с дебютом до 18 лет ( $n = 12$ ;  $p = 0,012$ , тест Кокса–Мантеля)

В то же время при подключении цензурированных наблюдений значимость отличий этих кривых пропадает, хотя они и отличаются по форме. Причина этого эффекта в наличии условного порога в развитии болезни длительностью около 5 лет с начала заболевания (Рисунок 7). На данном рисунке заметно отсутствие полных конечных точек в левом верхнем углу так же, как и цензурированных — в правом нижнем. При условии, что выборка отражает истинную превалентность болезни, наиболее опасным с точки зрения быстрого достижения конечной точки является течение заболевания в группе с дебютом до 5 лет. В этой группе средний риск (инцидент) достижения конечной точки за первые пять лет среди пациентов составил на 40% больше, чем в последующие 10 лет. В половине случаев (3 из 6) причиной достижения конечной точки в первые 5 лет являлось развитие синдрома ВС, в остальных — прогрессирование сердечной недостаточности. Интересно отметить, что в этой же группе можно говорить о наиболее благоприятном течении заболевания у тех пациентов, кто смог пережить 4–5 лет. При анализе течения заболевания в группе с дебютом после пяти лет средний риск достижения конечной точки за первые пять лет составил на 33% больше, чем в последующие 20 лет. В четырех из шести случаев причиной достижения конечной точки за первые 5 лет явилось быстрое прогрессирование сердечной недостаточности, в оставшихся двух — развитие синдрома ВС. В связи с тем, что в более чем половине случаев среди пациентов с идиопатической РКМП причиной достижения конечной точки в течение первых 5 лет явилось прогрессирование ХСН, крайне актуальной задачей является ранняя идентификация группы пациентов, которые могут быть своевременно включены в лист ожидания трансплантации сердца (ТС). В связи с чем нами был проведен анализ потенциальной возможности применения шкал расчета риска смерти от ХСН в группе пациентов с РКМП.

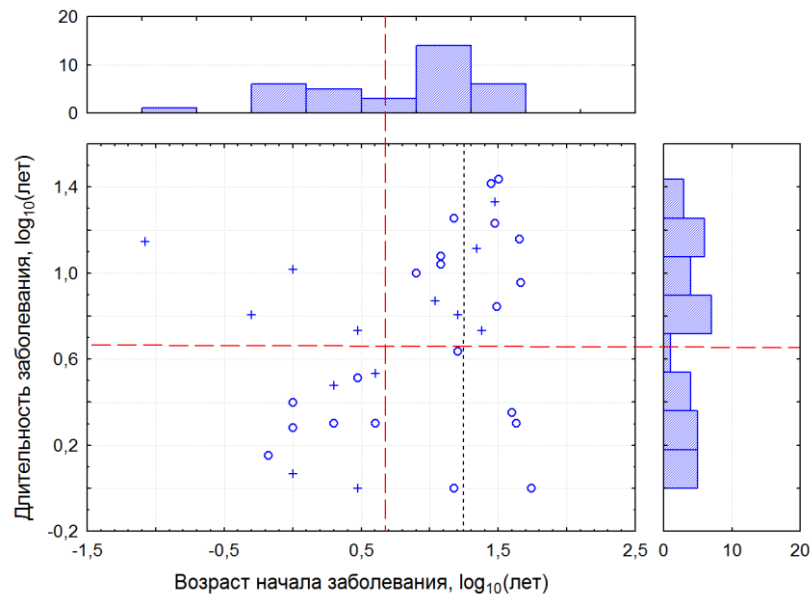


Рисунок 7 — Совместная диаграмма рассеяния возраста начала заболевания и его длительности. Оси представлены в логарифмическом масштабе. Штриховые линии — как горизонтальная, так и вертикальная — соответствуют уровню 5 лет, пунктир — 18 лет. Примерно в этих местах маргинальные гистограммы имеют «провалы». Кружки соответствуют полным наблюдениям, а плюсики — цензурированным

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

В группу идиопатической РКМП для расчета риска ХСН вошли только пациенты взрослого возраста, поскольку все известные шкалы валидизированы только для взрослых пациентов и для большинства из этих шкал не существует технической возможности оценки риска для пациентов младше 18 лет. Поскольку в некоторых из возможных для использования шкал входят такие параметры, как NT-proBNP и данные КРТ, в частности для шкал HFSS и MECKI, их использование в исследуемой группе пациентов также было невозможно в силу особенностей набора материала и недоступности данных тестов в ряде случаев. Таким образом, сравнительный анализ включал оценку информативности

следующих четырех шкал — SHFM (Seattle Heart Failure Model), MAGGIC (Meta-Analysis Global Group in Chronic Heart Failure Risk Calculator), 3С-HF (3С-HF Score) и MUSIC (MUerte Subita en Insuficiencia Cardiaca). При оценке риска неблагоприятного исхода с использованием шкал SHFM и MAGGIC рассчитывались одногодичный и трехгодичный риски смерти, а при использовании шкал 3С-HF и MUSIC — только одногодичный, как единственный доступный для данных шкал (Таблица 10). Для шкал SHFM, MAGGIC, 3С-HF риск оценивался в % вероятности достижения конечной точки (для шкал MAGGIC, 3С-HF) или % вероятности недостижения конечной точки (для шкалы SHFM). При расчете риска с использованием шкал MAGGIC и 3С-HF для анализа также был доступен интегральный балл, определяющий % вероятности наступления конечной точки. При использовании шкалы MUSIC риск неблагоприятного исхода ХСН отражался только в интегральных баллах без расчета % вероятности достижения конечной точки. При этом в рамках шкалы MUSIC данный интегральный балл рассчитывался отдельно для оценки вероятности как общей смертности, так и отдельно смертности от совокупности сердечно-сосудистых причин, внезапной смерти и смерти по причине систолической дисфункции. В группе пациентов, достигших конечной точки ( $n = 15$ , пациенты 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 19, 20, 22, 35), для расчета годового риска по вышеперечисленным шкалам использовались параметры, зарегистрированные за 8–12 месяцев до наступления конечной точки (Таблица 10). В группе пациентов, не достигших конечной точки ( $n = 5$ , пациенты 6, 10, 24, 29, 33), для расчета годового риска по вышеперечисленным шкалам использовались параметры, зарегистрированные не позднее чем за 12 месяцев до последнего наблюдения пациента. В целом все из апробированных шкал показали высокую диагностическую точность при разделении групп пациентов, достигших и не достигших конечной точки в течение 1 года. Так, использование SHFM продемонстрировало значимое различие одногодичного и трехгодичного риска достижения конечной точки

Таблица 10 — Клинические параметры, учитываемые при расчете прогноза ХСН по шкалам SHFM, MAGGIC, MUSIC и ЗС-НФ

Пациент	Возраст	Пол	СД	Наличие ХОБЛ	Диагноз в течение 18 мес	Курение	Класс СН (NYHA)	β-блокаторы	Фурасемид	Торасемид	Гипотиазид	Аллопуринол	Статины	К-сберегающие диуретики	ИАПФ	Импл. устр.	Натрий	Холестерин
1	18	М	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	142	4,2
	16		0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	142
2	58	Ж	0	0	0	0	4	1	10	20	25	0	0	50	0	1	138	2,8
	55		0	0	0	0	2	1	0	20	0	0	0	50	0	0	140	3,6
3	41	Ж	0	0	1	0	2	1	20	0	0	0	0	25	0	0	135	3,4
4	43	М	0	1	0	1	3	1	20	0	50	0	0	25	0	0	130	4,6
	40		0	1	0	1	2	1	10	0	0	0	0	25	0	0	134	4,4
5	16	М	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	136	3,1
6	43	Ж	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	132	4,7
7	22	Ж	0	0	0	0	4	1	120	0	0	1	0	0	1	0	155	3,0
	20		0	0	0	0	3	0	0	5	0	0	0	25	0	0	140	3,7
8	38	Ж	0	0	0	0	4	1	60	10	0	0	0	50	0	0	136	5,2
	35		0	0	0	0	3	1	20	0	0	0	0	50	0	0	129	3,5
9	59	Ж	0	0	0	0	3	1	0	20	12,5	0	1	100	1	1	141	5,5
	57		0	0	0	0	3	1	0	30	0	0	1	100	0	1	145	5,3
10	32	Ж	0	0	0	0	2	1	0	2,5	0	0	0	25	0	1	139	4,8
12	53	Ж	1	1	0	0	3	0	80	10	0	0	0	25	0	1	125	5,6
	49		0	1	0	0	3	1	40	0	0	0	0	25	1	0	144	5,4
13	55	Ж	0	1	1	0	3	1	0	5	0	0	1	25	1	0	133	4,9
17	49	М	0	0	0	0	3	1	40	0	0	0	0	0	1	0	149	5,0
	46		0	0	0	0	2	1	20	0	0	0	0	0	1	0	142	4,9
19	31	М	0	0	0	0	3	1	80	30	0	0	0	100	0	1	124	4,8
	27		0	0	0	0	2	1	80	20	0	0	0	100	0	1	143	5,1
20	22	Ж	0	0	0	0	4	1	60	0	0	0	0	50	1	0	132	3,1
	18		0	0	1	0	2	0	20	0	0	0	0	25	1	0	137	3,7
22	18	М	0	0	0	0	3	1	0	20	25	0	0	25	1	0	134	3,2
24	22	М	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	25	0	0	136	4,2
29	43	Ж	0	0	0	0	2	1	0	20	0	0	1	50	1	1	140	6,9
33	33	Ж	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	135	4,6
35	46	М	0	1	0	1	4	1	80	40	0	0	0	50	0	1	130	2,6
	44		0	1	0	1	3	1	40	15	0	0	0	75	1	1	132	3,1



Пациент	№	Лимф.	Моч. к-та	Вес	Рост	ИМТ	АД сист.	Креатинин	ФВ	ФП	MAGGIC интегр.	MAGGIC 1 г.	MAGGIC 3 г.	SHFM 1г.	SHFM 3 г.	3С-HF балл	3С-HF 1г.	MUSIC	MUSIC (серд.)	MUSIC (систо.)	MUSIC ВС
1	129	29	4,2	55	175	18,0	100	95	57	1	15	6,3	16,0	94,4	81,6	23	19	20	21	26	25
	135	29	4,2	64	175	20,9	120	95	76	0	12	4,8	12,2	97,5	88,3						
2	132	22	1,9	55	169	19,3	100	87	39	1	21	11,1	26,9	86,3	47,9	28	28	25	24	30	18
	108	17,1	4,9	53	169	18,5	115	89	61	0	17	7,8	19,1	94,3	74,4	10	5				
3	126	32	2,4	62	164	23,18	90	80	49	1	8	3,2	8,4	95,3	78,7	16	15	21	19	23	18
4	130	24	2,7	70	178	22,0	100	120	42	1	20	10,2	24,7	89,2	56,4	29	28	21	19	23	18
	155	20	4,1	74	178	23,0	120	94	55	1	12	4,8	12,2	96,3	82,8						
5	108	42	3,0	45	165	16,53	110	60	59	0	11	4,3	11,1	96,2	82,3	16	15	19	21	25	11
6	128	37	3,1	55	167	19,7	125	92	62	0	11	4,3	11,1	97,0	85,9	1	1	11	12	13	11
7	118	29	18,7	47	174	15,5	85	130	30	0	24	14,7	34,0	68,6	15,2	17	15	24	26	36	18
	127	37	4,3	58	174	19,0	100	58	30	0	24	13,4	31,6	93,9	73,0	25	28				
8	141	21	4,4	55	165	20,2	95	72	30	1	20	10,2	24,7	89,1	56,1	32	44	27	29	35	18
	152	30,9	5,1	62	165	22,7	110	65	46	1	13	5,2	13,4	94,6	76,0	21	18				
9	125	34	5,7	50	158	20,03	110	135	62	0	18	8,4	20,9	97,3	87,3	22	18	5,7	50	158	20,0
	141	35	19,1	53	158	21,2	120	101	72	0	17	7,7	19,1	97,7	89,2	23	19				
10	127	17	3,1	65	169	22,8	95	70	63	1	10	3,9	10,2	97,0	85,9	15	8	18	16	19	18
12	110	13	5,0	65	160	25,43	110	96	22	1	30	24,8	52,3	97,0	85,9	44	48	29	32	33	32
	120	34	7,4	68	160	26,5	110	80	55	1	13	5,2	13,4	96,5	83,5	30	29				
13	117	27	3,4	59	164	21,9	90	72	31	1	19	9,3	22,7	94,8	76,6	22	18	26	24	28	18
17	173	38	4,1	73	185	21	110	90	55	1	15	6,3	16,0	95,6	79,8	33	45	11	9	9	11
	162	32	4,6	77	185	22,5	110	84	60	1	9	3,6	9,2	97,8	89,6	1	1				
19	140	10	3,5	70	180	21,6	95	121	28	0	25	16,0	36,9	86,8	49,2	21	18	30	33	35	25
	155	29	4,8	80	180	24,7	115	69	39	0	13	5,2	13,4	98,4	92,3	8	4				
20	124	21	3,4	52	164	19,0	90	102	75	1	19	9,3	22,7	86,6	48,7	20	17	25	24	30	18
	132	26	3,3	59	164	22,0	115	96	77	0	10	3,9	10,2	96,8	85,0	4	2				
22	113	24	3,4	50	165	18	110	100	40	1	18	8,4	20,9	89,3	56,7	20	17	25	24	30	18
24	158	24	3,7	74	182	22,0	120	85	61	0	9	3,6	9,2	98,2	91,2	12	7	11	12	13	11
29	129	13,4	8,9	63	168	26,6	90	124	75	1	10	3,9	10,2	98,4	92,0	8	4	18	16	19	18
33	112	30	3,2	51	155	21,2	110	57	54	0	8	3,2	8,4	96,7	84,5	4	2	15	16	18	18
35	103	19	5,7	58	174	19,1	110	127	54	1	23	13,4	31,6	65,4	12,0	33	47	25	24	30	18
	124	20,0	4,6	77	174	25,4	100	108	67	1	17	7,7	19,1	90,2	59,7	21	18				

между двумя группами, подтверждая увеличенный риск в группе пациентов, достигших конечной точки (Рисунок 8).

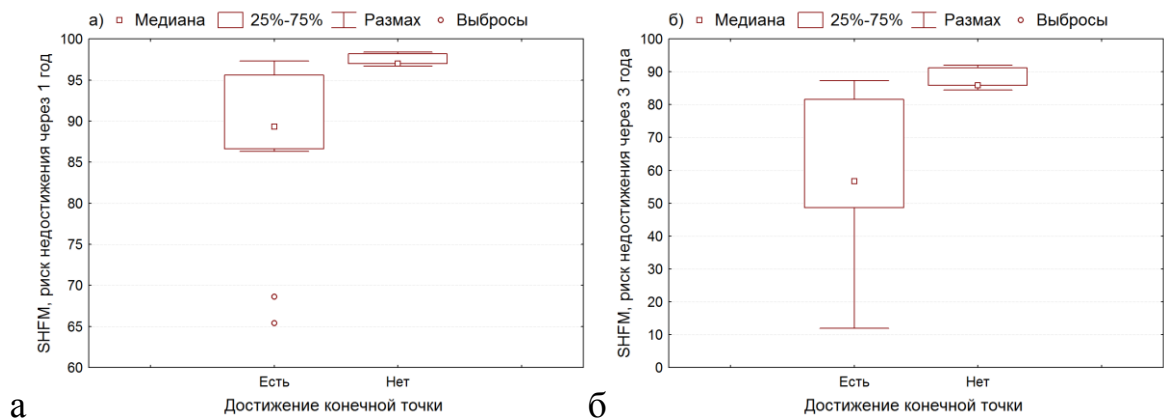


Рисунок 8 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы SHFM в группе пациентов с РКМП: (а) — риск недостижения конечной точки в течение 1 года; (б) — риск недостижения конечной точки в течение 3 лет; уровень значимости различия по критерию Манна–Уитни в обоих случаях равен  $p = 0,0045$

Использование шкалы MAGGIC также продемонстрировало значимое различие интегрального балла, одногодичного и трехгодичного риска достижения конечной точки между двумя группами, подтверждая увеличенный риск в группе пациентов, достигших конечной точки (Рисунок 9). В большинстве случаев пациенты, достигшие конечной точки, имели значение интегрального балла более 12 и вероятность достижения конечной точки в течение 1 года более 5% за исключением двух пациентов, умерших в результате синдрома ВС.

Сравнительная характеристика двух вышеперечисленных шкал, проиллюстрирована на Рисунке 10 с помощью диаграммы рассеяния. Штриховые линии на этом рисунке отражают наиболее эффективные пороги решающих правил для калькуляторов на исследуемой группе пациентов, рассчитанные ниже. На Рисунке 10 видна разная устойчивость калькуляторов риска смерти от ХСН, получаемых при небольших сдвигах пороговых линий как по отношениям численностей отсекаемых групп — оценкам вероятностей, так и по их составу.

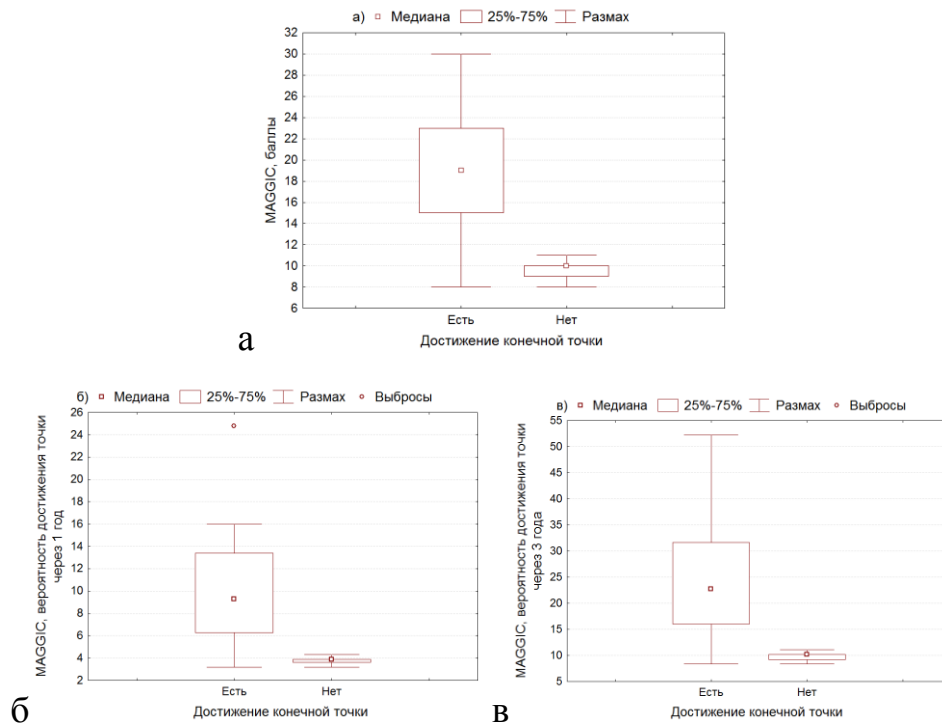


Рисунок 9 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы MAGGIC в группе пациентов с РКМП: (а) — интегральный балл; (б) — риск достижения конечной точки в течение 1 года; (в) — риск достижения конечной точки в течение 3 лет ( $p = 0,0045$ ); уровень значимости различия по критерию Манна–Уитни во всех случаях равен  $p = 0,0045$

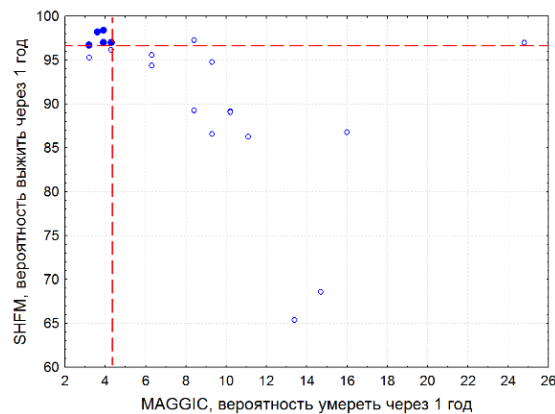


Рисунок 10 — Совместная диаграмма рассеяния одногодичного риска достижения конечной точки при использовании шкал для шкалы SHFM и MAGGIC: оси представлены вероятностью достижения по шкале MAGGIC (ось X) и вероятностью недостижения по шкале SHFM (ось Y). Штриховые линии соответствуют уровням 4,3% (вертикальная) и 96,7% (горизонтальная)

Использование шкалы MUSIC также продемонстрировало значимое различие интегрального балла в группах пациентов, достигших и не достигших конечной точки (Рисунок 11). Данное различие было значимым как при оценке общего риска достижения конечной точки (Рисунок 11а), так и отдельно для риска достижения конечной точки по совокупности сердечно-сосудистых причин (Рисунок 11б) и по причине развития систолической дисфункции (Рисунок 11в). Важно отметить, что при оценке риска достижения конечной точки вследствие ВС использование данной шкалы не было информативно и не дало значимого различия между группами пациентов, достигших и не достигших конечной точки. Возможно, это связано с тем, что в исследуемой группе только двое пациентов умерли вследствие синдрома ВС и развитие данного синдрома у пациентов с РКМП определяется первичной генетической причиной кардиомиопатии и вызванной ею электрической нестабильностью миокарда. Поскольку использование данной шкалы не позволяет рассчитать вероятность достижения конечной точки в %, риск развития неблагоприятного исхода определяется как высокий при интегральном балле более 20 и низкий — при интегральном балле менее 20. Таким образом, применение данной шкалы в исследуемой когорте пациентов с РКМП продемонстрировало 100% специфичность, но не обладало достаточной чувствительностью в отношении положительной предсказательной ценности (только 80% пациентов, достигших конечной точки, имели интегральный балл более 20). Наибольшей прогностической точностью при оценке годового риска достижения конечной точки обладала шкала 3С-НФ. Именно при использовании данной шкалы удалось достичь 100%-й классификации пациентов на достигших и не достигших конечной точки (Рисунок 12). Все пациенты, имеющие интегральный балл  $\geq 16$  и риск  $\geq 15\%$ , достигали в течение года конечной точки, в то время как в группе пациентов, не достигших конечной точки, данные параметры составляли  $\leq 15$  баллов и  $< 8\%$ .

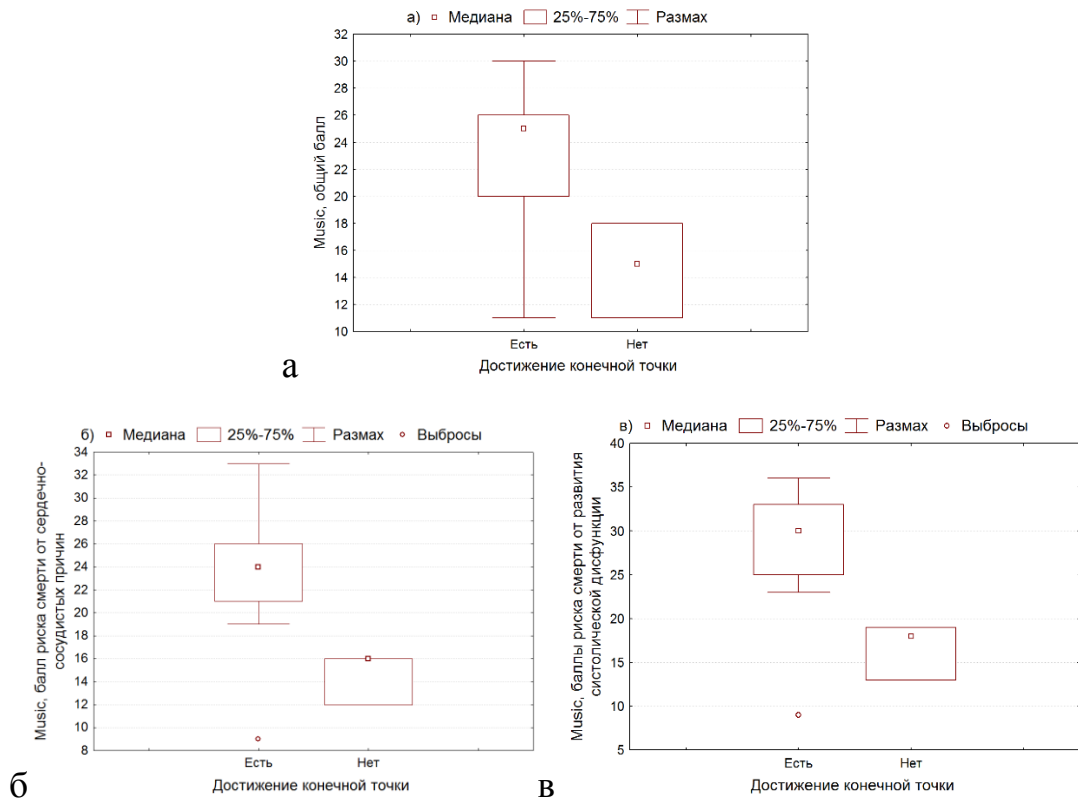


Рисунок 11 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы MUSIC в группе пациентов с РКМП.

В скобках приведен уровень значимости различия по критерию Манна–Уитни:

(а) — интегральный балл ( $p = 0,0033$ ); (б) — балл сердечно-сосудистых причин ( $p = 0,0041$ ); (в) — балл систолической дисфункции ( $p = 0,0043$ )

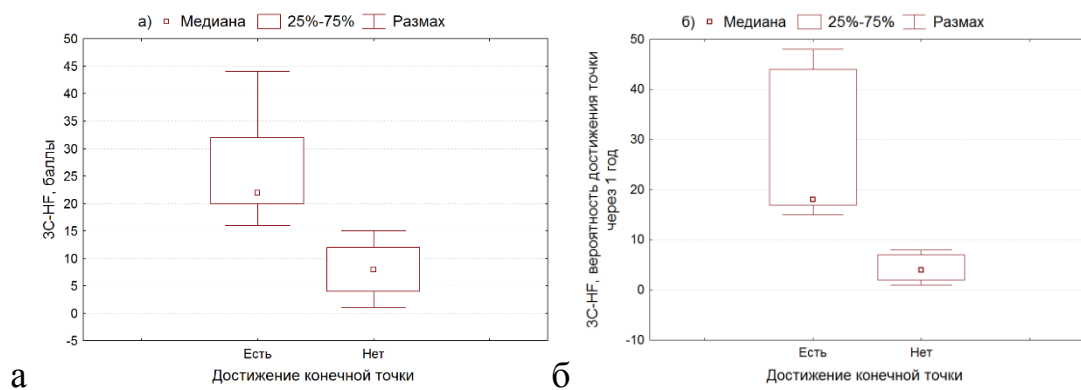


Рисунок 12 — Сравнение риска неблагоприятного исхода ХСН с помощью шкалы ЗС-НФ в группе пациентов с РКМП: (а) — интегральный балл; (б) — риск достижения конечной точки в течение 1 года; уровень значимости различия по критерию Манна–Уитни в обоих случаях равен  $p = 0,001$

Таким образом, нами было показано, что все из перечисленных шкал являются информативными в отношении расчета риска ХСН в группе пациентов с РКМП и потенциально могут быть применены на больших когортах пациентов для определения пороговых значений при определении показаний для включения пациентов в лист ТС. Однако полученные данные позволяют лишь определять группу пациентов высокого риска и не отражают возможность применения данных шкал для динамической оценки клинического состояния пациентов. Для определения возможности использовать вышеперечисленные шкалы в динамике для оценки изменений клинического статуса пациента нами был проведен расчет риска ХСН для группы пациентов, достигших конечной точки за 3–4 года до достижения таковой. Полученные данные были сопоставлены с расчетным риском за 1 год до достижения конечной точки. Параметры для проведения подобного расчета были доступны только для шкал SHFM, MAGGIC и 3С-НФ и только для 11 пациентов из 20, достигших конечной точки (пациенты 1, 2, 4, 7, 8, 9, 12, 17, 19, 20, 35). Таким образом, при помощи шкал SHFM, MAGGIC и 3С-НФ мы ретроспективно сравнили динамику расчетного риска достижения конечной точки у пациентов в течение 3 лет (Рисунок 13).

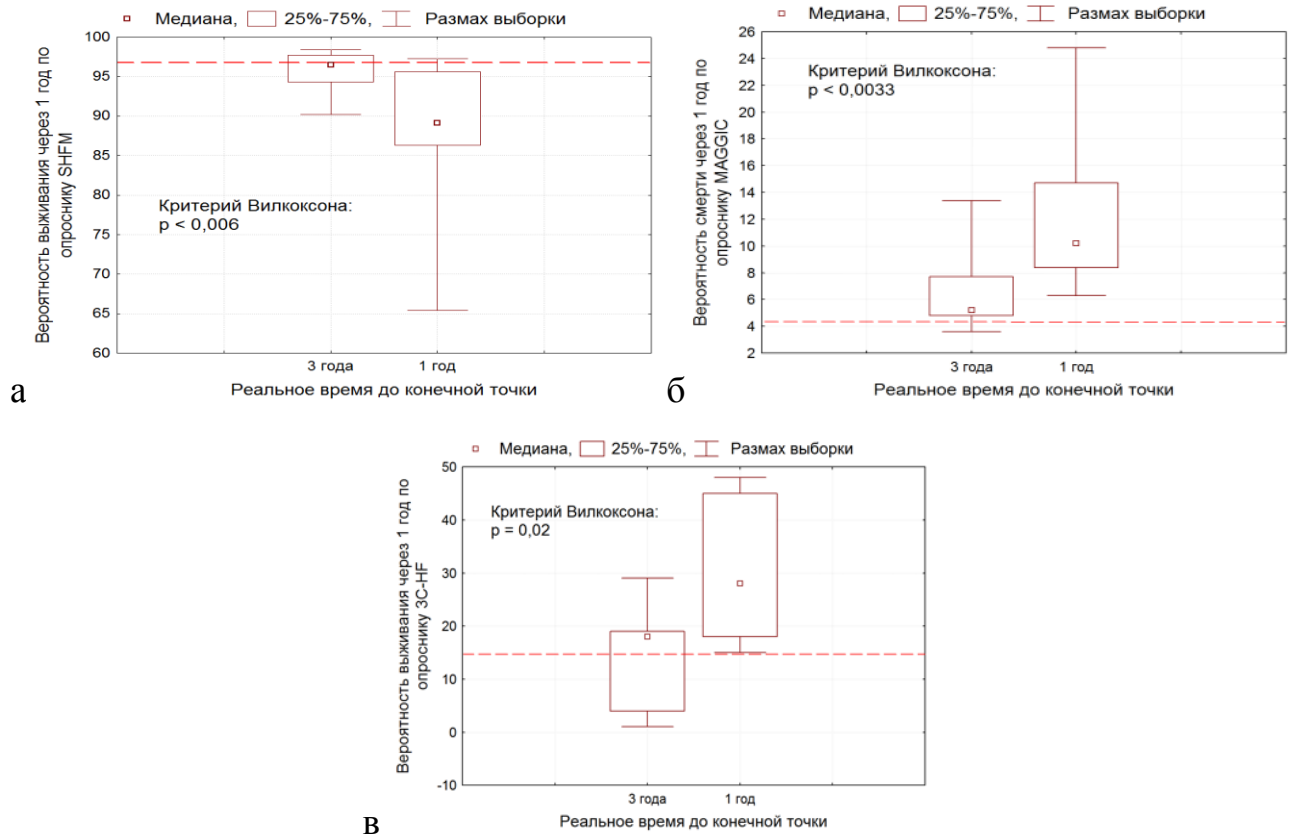


Рисунок 13 — Ретроспективное продольное сравнение калькуляторов SHFM (а), MAGGIC (б) и 3C-HF (в) в группе РКМП за 3 года и за 1 год до достижения пациентами конечной точки.

Штриховая линия соответствует уровню вероятности, выбранному для оптимального решающего правила для калькуляторов SHFM, MAGGIC и 3C-HF (ROC-анализ калькуляторов — см. Рисунок 14)

Проведенный ретроспективный анализ за 3 года показал, что риск пациентов значительно возрастает в течение 3 лет и, соответственно, обе тестируемые шкалы могут быть информативными для оценки состояния пациентов в динамике. В то же время вероятность достижения пациентами конечной точки за 3 года до смерти/трансплантации сердца для большинства пациентов была все же выше уровня вероятности, выбранного для оптимального решающего правила. Это говорит о необходимости на данном этапе увеличения группы пациентов и количества наблюдений для установки оптимального решающего правила в группе

пациентов с РКМП для оценки риска неблагоприятного исхода РКМП и определения оптимальных пороговых значений для включения в лист ТС.

Сравнение информативности и диагностической точности четырех апробированных калькуляторов было проведено с помощью ROC-анализа «чувствительность-специфичность» (Рисунок 14). Представленные на Рисунке 14 ROC-кривые приводят к разным пороговым значениям для наиболее эффективных решающих правил с точки зрения баланса «чувствительность-специфичность». Так для калькулятора 3С-НФ такое правило дает 100%-ю классификацию (точка А на кривой). Для MAGGIC и MUSIC решающее правило разделит пациентов в соотношении 6 против 14 (точка Б на кривой), в то время как по калькулятору SHFM (точка В) — 7 против 13. При этом для 3С-НФ, MAGGIC и MUSIC пороговой оказывается оценка *вероятности умереть* через 1 год, равная, соответственно, 15%, 4,3% и 18% (по верхней квантильной точке), а для SHFM — *вероятность выжить* через 1 год, равная 96,7%. В соответствующем решающем правиле отношение шансов для калькуляторов MAGGIC и MUSIC составило:  $OR = 0,018$  с 95%-м доверительным интервалом  $CI = [0,0009; 0,35]$ , а для SHFM:  $OR = 0,038$ ,  $CI = [0,0027; 0,54]$ .

Все три доверительных интервала не содержат 1, что говорит о статистически значимом прогнозе всех решающих правил.

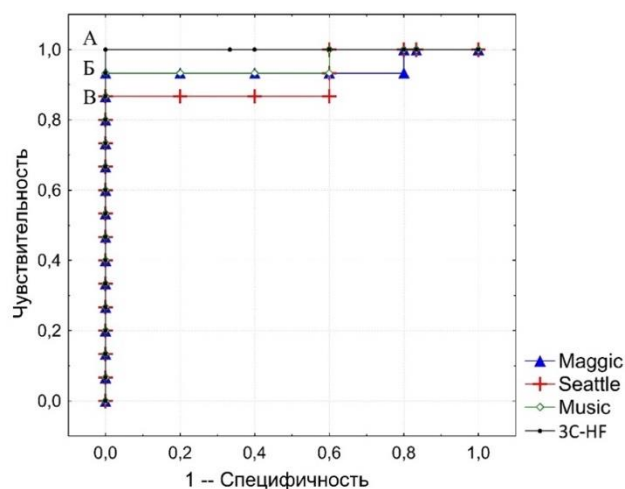


Рисунок 14 — ROC-кривые результатов калькуляторов MAGGIC, SHFM, MUSIC и 3С-НФ оценки вероятности выжить через 1 год для исследуемой группы больных ( $n = 20$ )



Тест Фридмана для связанных множественных ранжированных значений итоговых баллов калькулятора не улавливает статистически значимого различия ( $p = 0,55$ ), что говорит о схожести результатов прогноза по калькуляторам.

В целом все калькуляторы обладают хорошей точностью на исследуемой небольшой группе пациентов: для всех площадей под графиками (area under the curve — AUC) оценок ROC-кривых по исследуемой группе  $AUC > 0,9$ . В то же время по диагностической точности (в смысле площади под ROC-кривой) можно расположить калькуляторы в следующем порядке, представленном в Таблице 11.

С целью выявления наиболее значимых параметров в процессе расчета вероятности неблагоприятного исхода ХСН нами был проведен дискриминантный анализ (ДА) с оценкой весового значения отдельных факторов. Процедура пошагового (с включением) ДА была применена для 17 признаков, входящих в состав калькуляторов риска, на группе из 20 пациентов (Рисунок 15). Исходные признаки: класс ХСН (NYHA), ФВ ЛЖ, наличие ФП, уровень креатинина, прием АМКР, ИАПФ, возраст, содержание лимфоцитов в %, наличие имплантированных устройств, уровни  $Na^+$ , холестерина, гемоглобина, мочевой кислоты, вес, рост, ИМТ, систолический уровень артериального давления. В результате в итоговую модель были включены 8 признаков (Таблица 12). Признаки упорядочены по абсолютной величине их факторных нагрузок. Полученные данные свидетельствуют о ведущей роли таких факторов, как функциональный класс ХСН, ФВ ЛЖ и наличие ФП в определении прогноза пациентов с РКМП.

Таблица 11 — Значение AUC для тестируемых шкал расчета риска

Шкала	AUC
3С-HF	1
MUSIC	0,954
MAGGIC	0,947
SHFM	0,920

Таблица 12 — Характеристики дискриминантной функции (ДФ) для 17 признаков

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

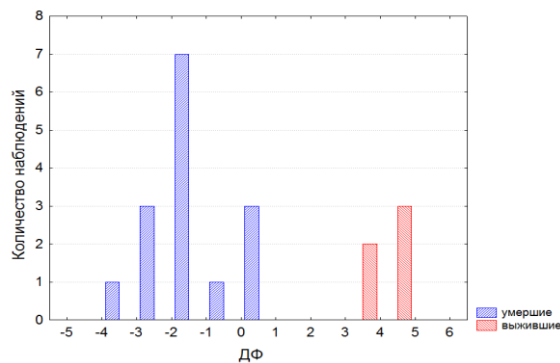


Рисунок 15 — Гистограмма значений ДФ, зависящей от 8 отобранных признаков, на двух группах выживших и умерших за 1 год пациентов.

Полученная ДФ дает 100%-ю классификацию пациентов двух исследуемых групп из исследуемой выборки

## **Глава 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ СПЕКТР ИДИОПАТИЧЕСКОЙ РЕСТРИКТИВНОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

### **4.1. Качество проведенного секвенирования, глубина покрытия и классификация новых и ранее описанных генетических вариантов**

При исследовании генетической природы РКМП и использовании целевого секвенирования нового поколения 99% всех целевых нуклеотидов искомого региона имели глубину покрытия 10 и более прочтений, 95% образцов искомого региона имели глубину покрытия 50 и более, 90% образцов искомого региона имели глубину покрытия 100 и более.

Для определения патогенности новых и ранее описанных генетических вариантов при генетическом исследовании методом массового параллельного секвенирования в когорте пациентов с РКМП нами были применен подход, основанный на рекомендациях Американского общества по медицинской генетике (ACMG) [342]. Данная классификация позволяет определять клиническую значимость обнаруженных вариантов и может быть использована при медико-генетическом консультировании, поскольку имеет строгие критерии причинной связи с фенотипом и доказательства патогенности. Применение данной классификации целесообразно в клинической практике, а также в научных исследованиях для строгого определения связи генотипа с фенотипом. Недостатком данной классификации является невозможность достоверно судить о новых, ранее не описанных генетических вариантах без проведения широкомасштабных клинических исследований с использованием больших когорт пациентов, либо без функциональных исследований на клеточном уровне или с применением животных моделей.

## 4.2. Анализ генетических вариантов в соответствии с классификацией ACMG

Все обнаруженные генетические варианты были соотнесены с базами данных Exac02 и GnomAd, а также с базой данных ClinVar. Кроме того, для каждого пациента были проанализированы редкие полиморфизмы с частотой 1:1000 — 1:10000 (MAF% 0,1–0,01) в соответствии с базой данных Exac02.

Алгоритм генетического анализа в группе из 35 пациентов с идиопатической РКМП представлен на Рисунке 16.



Рисунок 16 — Алгоритм биоинформатического анализа в группе с РКМП

На первом этапе секвенирование нового поколения проводилось с использованием целевой панели из 108 генов (Таблица 2). Данный подход позволил выявить патогенные и вероятно-патогенные варианты у 19 из 35 пациентов (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 17, 19, 20, 21, 28, 29, 32, 33, 35). Еще у 5 пациентов идентифицированные варианты были классифицированы как варианты неопределенной значимости по классификации ACMG в связи с их выявлением впервые, однако с учетом функциональной значимости или локализации в саркомерных генах, они были расценены нами как потенциально причинные в отношении развития заболевания (пациенты 11, 23, 24, 30 и 34). В группе из оставшихся 11 пациентов с целью идентификации генетической причины заболевания было проведено полноэкзомное секвенирование. В результате экзомного секвенирования патогенные и вероятно-патогенные замены были обнаружены у 7 пациентов (9, 15, 16, 22, 25, 26, 31), а варианты неопределенной значимости в генах с высокой степенью экспрессии в миокарде у 3 пациентов (7, 10 и 27). У одного пациента (18) экзомное секвенирование не выявило новых патогенных, вероятно-патогенных или вариантов с неопределенной значимостью в генах с высокой степенью экспрессии в миокарде (Рисунок 16).

После аннотации всех вариантов с помощью программного пакета ANNOVAR для последующего анализа использовалось 28 патогенных или вероятно-патогенных варианта и 40 вариантов неопределенной значимости. Патогенные и вероятно-патогенные варианты были выявлены в 12 из 108 исследуемых генов. В результате доля положительно-генотипированных пациентов составила 74% (26 пациентов) (Рисунок 17). Из 28 патогенных и вероятно-патогенных вариантов 16 были обнаружены в генах, кодирующих белки саркомера (*MYH7* — 5, *MYBPC3* — 4, *MYH6* — 1, *TNNI3* — 4, *TNNT2* — 1, *MYL2* — 1) и 12 в генах, кодирующих структурные белки цитоскелета (*BAG3-1*, *JUP-1*, *ACTN2-1*, *DES-1*, *NEBL-1*, *FLNC-7*) (Рисунок 17а, б).

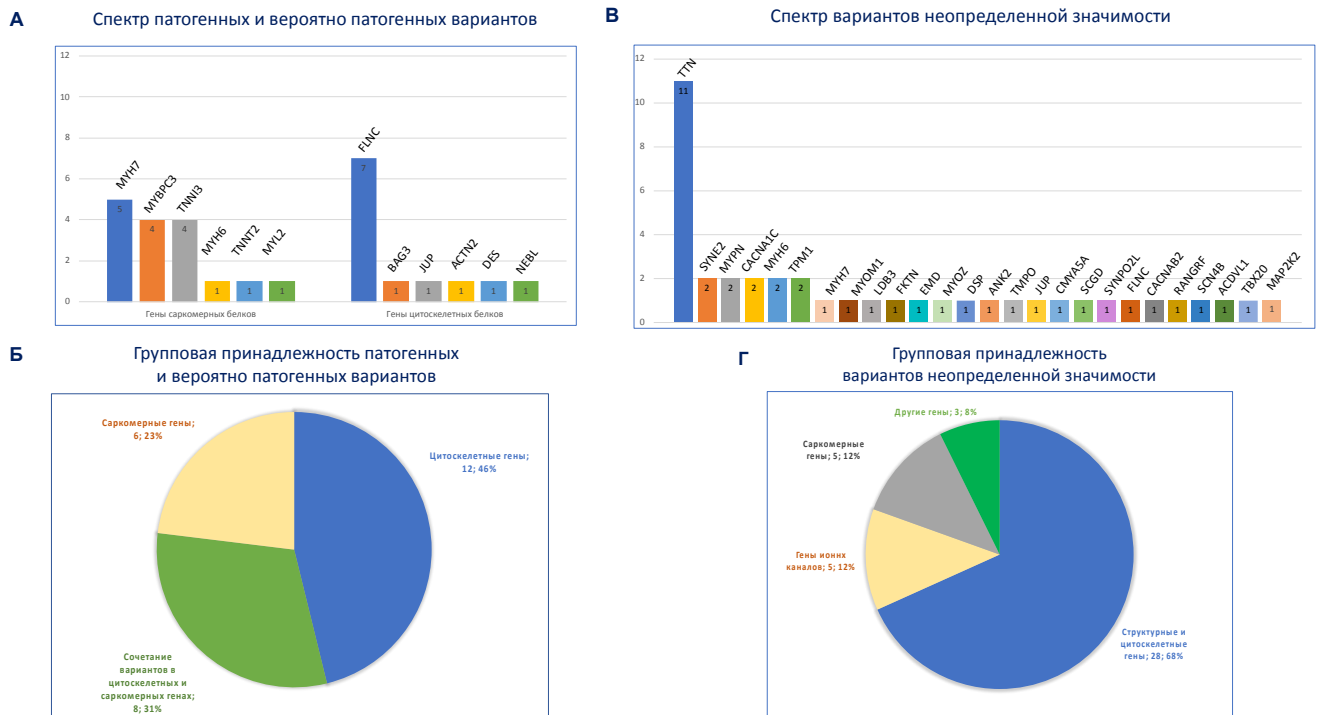


Рисунок 17 — Спектр патогенных, вероятно-патогенных вариантов (а, б) и вариантов неопределенной значимости (в, г) в группе пациентов с РКМП

Среди 40 вариантов неопределенной значимости 27 были выявлены в структурных и цитоскелетных генах (*TTN*, *SYNE2*, *MYOM1*, *FKTN*, *LDB3*, *EMD*, *MYOZ*, *DSP*, *TMPO*, *MYPN*, *ANK2*, *JUP*, *CMYA5*, *SGCD*, *SYNPOL2*), 5 в генах ионных каналов (*CACNB2*, *RANGRF*, *SCN4B*, *CACNA1C*), 5 в генах, кодирующих сократительные саркомерные белки (*MYH6*, *MYH7* и *TPM1*) и в 3 генах, кодирующих другие белки (*ACDVL*, *TBX20* и *MAP2K2*) (Рисунок 17в, г). Как и ожидалось, большинство вариантов неопределенной значимости были обнаружены в гене *TTN*. Среди 26 положительно-генотипированных пациентов у 12 (46%) причинный генетический вариант был обнаружен в генах цитоскелетных белков (пациенты 1, 4, 8, 9, 15, 16, 19, 22, 25, 26, 27, 35), а 14 (54%) в генах, кодирующих саркомерные белки (пациенты 2, 3, 5, 6, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 28, 29, 32, 33). При этом из 14 пациентов только у 6 (23%) патогенный вариант в саркомерном гене являлся изолированным, а у оставшихся 8 пациентов (31%) патогенный или вероятно-патогенный генетический вариант в гене, кодирующем саркомерный

белок, был ассоциирован с вариантом неопределенной значимости в цитоскелетных генах (6, 12, 13, 14, 21, 29, 32, 33) (Рисунок 17б).

Перечень всех выявленных патогенных и вероятно-патогенных вариантов представлен в Таблице 13.

Таблица 13 — Список патогенных, вероятно-патогенных вариантов и вариантов неопределенной значимости у пациентов с РКМП при использовании метода целевого секвенирования с применением панели из 108 генов и экзомного секвенирования

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
1	П	BAG3	chr10:121431885:C>T NM_004281:P209L	rs121918312	–	Д	TTN	rs775733174	chr2:179428256:T>C NM_001267550:T27535A	0,0004	Н
							MYOM1	rs376646252	chr18:3085111:C>T NM_003803:G1424E	0,0008	Д
2	ВП	TNNT2	chr1:201332505:CTC>- NM_001001432:158_158del	–	–	–	–	–	–	–	–
3	П	MYH7	chr14:23894612:C>T NM_000257:G768R	rs727503260	–	Д	–	–	–	–	–
4	ВП	JUP	chr17:39925402:G>A NM_021991:R176W	rs368336007	0,006	Д	CACNB2	–	chr10:18787342:A>G NM_201597:D131G	–	Д
5	П	TNNI3	chr19: 55663260:G>A NM_000363:R192H	rs104894729	–	Д	–	–	–	–	–
6	П	MYBP3	chr11:47354816:TCCAC>- NM_000256: E1085fs	–	–	–	FKTN	–	chr9:108377558:G>A NM_006731:781-1G>A	–	–
7	–	–	–	–	–	–	TTN	rs375533809	chr2:179629287:C>T NM_133379:V3319I	0,0005	Н
							TBX20	–	chr7: 35244135:949delT NM_001077653.2:Y317fs	–	–
8	ВП	ACTN2	chr1:236889307:A>T NM_001278343:N175Y	–	–	Д	–	–	–	–	–



Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
9	ВП	FLNC	chr7: 128494631:G>T NM_001458: P2298S	rs1114167361	-	Д	RANGRF	rs201464864	chr17:8192147:T>C NM_016492:F14S	0,001	Д
							ACADVL	rs730880036	chr17:7121058:A>G NM_001270447:I18V	0,001	Н
10	-	-	-	-	-	-	SYNPO2L	-	chr10: 5407587:C>T NM_001114133: S608N	-	Н
11	-	-	-	-	-	-	TPM1	-	chr15: 63349230:A>T NM_001018005:E96V	-	Д
12	ВП	MYH7	chr14:23893311:G>C NM_000257:I909M	rs377722048	0,005	Д	LDB3	rs530979771	chr10:88441527:G>A NM_001171610:R219Q	0,004	Н
							EMD	-	chrX:153608649:G>T NM_000117:E107D	-	Н
13	П	MYBP3	chr11:47353740:G>A NM_000256:Q1233X	rs397516037	0,0008	-	TTN	rs68380109	chr2:179445166:C>A NM_001267550:D22314Y	-	Н
							TTN	rs781676050	chr2:179640343:C>A NM_133379:R2083I	0,001	Н
							TTN	rs77226439	chr2:179399559:T>C NM_001267550:Q33928R	0,001	Н
14	ВП	MYBP3	chr11:47371630:G>A NM_000256:P147L	rs730880615	0,06	Н	MYOZ2	-	chr4:120072047:G>C NM_016599:G33R	-	Д
	П	MYH7	chr14:23894139:C>A NM_000257:L840M	rs730880747	-	Д					
15	П	FLNC	chr7: 128485066-7:GC>CT NM_001458: A1183L	-	-	Д	TTN	-	chr2:179441101:G>A NM_001267550:T23253I	-	Д
16	П	FLNC	chr7: 128485076:C>T NM_001458: A1186V	rs1114167361	-	Д	-	-	-	-	-

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
17	ВП	MYH7	chr14:23894566:C>T NM_000257:R783H*	rs397516142	0,002	Д	–	–	–	–	–
18	–	–	–	–	–	–	SYNE2	rs548596262	chr14:64692150:C>T NM_182914:S6877F	0,002	Н
							DSP	rs730880090	chr6:7580808:G>T NM_004415:S1462I		Н
							TTN	–	chr2:179482230:C>T NM_001267550:S15861N		Н
19	П	DES	chr:2:220285069:G>A NM_001927:c.735+1G>A	–	–	–	–	–	–	–	
20	П	TNNI3	chr19: 55665445:G>- NM_000363.4:c.[5026del G], p.D168TfsTer8	–	–	–	–	–	–	–	
21	П	TNNI3	chr:19:55665439:G>A NM_000363:R170W	–	–	Д	SCN4B	rs752094091	chr11:118015854:A>G NM_174934:L51P	0,0008	Д
							SYNE2	rs752789740	chr14:64496643:C>T NM_182914:R2249X	0,0004	–
22	П	FLNC	chr7: 128485076:C>T NM_001458: A1186V	rs1114167361	–	Д	TTN	rs768267695	chr:2:179414366:A>G NM_001267550:S30695P	0,0004	Д
23	–	–	–	–	–	–	MYH7	rs565663412	chr14: 23885272:G>A NM_000257: A1632T	0,003	Д
24	–	–	–	–	–	–	TTN	–	chr2:179615440:G>A NM_133379:A3896V	–	Н
							CACNA1C	–	chr12:2774110:T>C NM_199460:F1499S	–	Д
							TMPO	–	chr12:98927898:A>T- NM_003276:T621fs	–	–
							FLNC	rs199705417	chr7:128481541:G>A- NM_001458: G681S	0,005	Д

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
25	П	FLNC	chr7: 128485076:G>T NM_001458: A1186V	rs114167361	–	Д	–	–	–	–	–
26	П	FLNC	chr7: 1128494628:G>A NM_001458: V2297V	–	–	Д	–	–	–	–	–
27	–	–	–	–	–	–	CMYA5	–	chr5: 79026636:A>G NM_153610: E683G	–	Н
28	П	TNNI3	chr:19:55665439:G>A NM_000363: R170G	rs727503504	–	Д	–	–	–	–	–
29	ВП	MYBP C	chr:11:47364206:1543- 1547del NM_000256: N515fs	–	–	Д	TTN	–	chr12: 179582828:C>A NM_133379: T8302K	–	Н
	ВП	MYH6	chr14: 23862177:G>C NM_002471: Q1065H	rs267606904	0,03	Д	MYH6	rs201827489	chr14: 23856794:C>T NM_002471: R1532C	0,01	Д
30	–	–	–	–	–	–	TTN	–	chr12: 179415873:G>A NM_133379:R30462Q	–	Д
							MYPN	rs201454261	chr10: 69881997:C>T NM_001256267:P268S	0,04	Н
							MYH6	rs1322506642	chr14: 23858646:C>G NM_002471: Q1312E	0,003	Д
31	ВП	FLNC	chr7: 128489034:4926_4927del NM_001458: T1642fs	–	–	–	–	–	–	–	
32	ВП	MYH7	chr14 23901007:T>C NM_000257: I201T	rs397516258	–	Н	MYPN	rs201454261	chr10: 69881997:C>T NM_001256267:P268S	0,04	Н
							MAP2K2	rs749615795	chr19: 4090636:G>A NM_030662: R388Q	0,00009	Н
33	ВП	MYL2	chr12: 111358331:G>A NM_000432: M11*	–	–	Н	ANK2	–	chr4: 114275041:C>T NM_001148: P1756L	–	Д
							SGCD	–	chr5: 155771533:C>G NM_172244:T13S	–	Н

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты						Варианты неопределенной значимости				
	Категория по классификации ACMG	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предсказанный эффект
34	–	–	Окончание Таблицы 13		–	–	TPM1	–	chr15: 63340841:G>T NM_001330351: A23S	–	Н
							JUP	–	chr17: 39925375:C>G NM_021991: L185V	–	Н
							CACNA1C	rs370432385	chr12: 2786373:G>A NM_199460: A1696T	0,008	Д
35	ВП	NEBL	chr10: 21129751:G>T NM_006393.2: E419X*	rs201103536	0,009	–	–	–	–	–	–

\* — варианты, обнаруженные в гомозиготном состоянии; Н (Tolerated) — нейтральный предсказанный структурный эффект замены, Д (Damaging) — патогенный предсказанный структурный эффект замены. Предсказание структурного эффекта проводилось с помощью программного пакета MetaSVM. П — патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG; ВП — вероятно-патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG.

Данные предсказательного моделирования представлены в Таблице 14.

Таблица 14 — Данные предсказательного моделирования патогенного эффекта обнаруженных генетических вариантов

Ген	Замена	Используемая биоинформатическая программа расчета									
		SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT <sup>1</sup>	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	PROVEA N	CAD	Meta SV
ACADVL	I18V	T	T	T	–	T	–	D	T	0,00	T
ACTN2	N175Y	D	D	D	D	D	H	T	D	28,20	D
ANK2	Q2048R	D	P	P	T	T	M	T	T	9,46	T
ANK2	S2064T	T	P	T	T	T	L	T	T	0,18	T
ANK2	P1756L	D	D	D	D	D	M	D	D	29,3	D
BAG3	P209L	D	D	D	D	D	M	D	D	34,00	D
CACNA1C	F1499S	D	D	D	D	D	M	D	D	31,00	D
CACNA1C	A1736G	T	T	T	T	T	N	D	T	21,70	T
CACNA1C	T1953M	T	P	P	T	D	L	T	T	22,40	T
CACNA1C	A1696T	T	B	B	N	D	N	D	N	15,65	D
CACNB2	D131G	D	D	D	D	D	M	D	D	27,70	D
CMYA5A	E683G	D	B	B	N	N	M	T	D	24,2	T
DSP	S1462I	T	P	T	D	D	N	D	T	22,80	T
EMD	E107D	T	D	T	D	T	L	D	T	13,46	T
EYA4	D327N	T	P	T	D	D	N	T	T	22,50	T
FLNC	A1183L	D	D	D	–	D	–	D	D	–	D
FLNC	A1186V	D	D	D	D	D	M	D	D	26,3	D
FLNC	P2298S	D	D	D	D	D	M	D	D	28,3	D
FLNC	P2297M	D	D	D	D	D	M	D	N	30,0	T
FLNC	G681S	D	D	D	D	D	M	T	D	28,1	D
HCN4	E1193Q	T	T	T	–	D	L	D	T	22,70	D
ILK	L53M	D	D	D	D	D	M	D	T	24,00	D
ILK	R211C	D	D	P	D	D	M	D	D	34,00	D
ILK	R211H	T	T	T	D	D	L	N	T	22,80	D
JPH2	T286A	D	P	P	D	D	M	T	D	24,20	T
JUP	R176W	D	D	D	D	D	M	T	D	25,20	D
JUP	L185V	D	B	B	D	D	N	T	N	23,0	T
KCNH2	L1045F	T	D	P	D	D	M	D	D	23,90	D
LDB3	R219Q	T	D	D	T	D	L	T	T	24,60	T
MAP2K2	R388Q	D	B	B	N	D	L	T	N	23,3	T
MYBPC3	Q1232X	–	–	–	–	D	–	–	–	41,00	–

Ген	Замена	Используемая биоинформатическая программа расчета									
		SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT <sup>1</sup>	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	PROVEA N	CAD	Meta SV
MYBPC3	P147L	D	T	T	-	T	N	T	T	14,88	T
MYH6	R1532C	D	D	D	D	D	M	D	D	34	D
MYH6	Q1312E	D	D	D	-	D	M	D	N	23,1	D
MYH6	Q1065H	D	D	D	-	D	M	D	D	27,2	D
MYH7	I201T	T	B	B	-	D	N	D	N	10,3	T
MYH7	I909M	D	D	D	-	D	M	D	T	24,00	D
MYH7	R783H	T	P	P	-	T	L	D	T	25,20	D
MYH7	G768R	D	D	D	-	D	M	D	D	35,00	D
MYH7	A1632T	D	D	D	-	D	H	D	D	27,50	D
MYH7	L840M	D	D	D	-	D	H	D	T	25,10	D
MYL2	M1I	D	B	B	N	D	-	T	N	24,7	T
MYOM1	G1424E	D	D	D	D	D	M	T	D	35,00	D
MYOM1	P396S	D	T	T	T	D	N	T	D	24,40	T
MYOZ2	G33R	D	D	D	D	D	M	D	D	28,90	D
MYPN	D221V	T	D	P	T	D	N	T	T	15,62	T
MYPN	P268S	D	D	D	D	D	M	T	D	27,4	T
NEBL	Y89X	-	-	-	D	D	-	-	-	35,00	-
NEBL	E419X	D.	-	-	D	D	-	-	-	38,00	-
PDLIM3	S299N	T	T	T	T	D	N	D	T	17,29	T
RANGRF	F14S	D	D	D	D	D	M	T	D	25,60	D
SCN4B	L51P	D	D	D	D	D	M	D	D	29,90	D
SCN5A	P2006A	T	T	T	T	T	N	D	T	0,00	T
SCGD	T12S	T	B	B	N	N	N	T	N	7,27	T
SYNPO2L	S608N	T	B	B	N	N	M	T	N	19,66	T
SYNE1B	L8619P	D	D	D	T	D	M	T	D	32,00	T
SYNE2	R2249X	-	-	-	T	D	-	-	-	37,00	-
SYNE2	S6877F	T	T	T	T	D	N	T	T	23,40	T
TMEM43	R240C	D	D	D	D	D	M	T	D	28,30	T
TMPO	R274K	T	T	T	T	T	N	T	T	0,31	T
TNNI3	R170W	D	D	D	D	D	M	D	D	32,00	D
TNNI3	R170G	D	D	D	D	D	M	D	D	27,4	D
TNNI3	R192H	D	D	D	D	D	D	D	D	35,0	D
TPM1	A23S	T	B	B	-	D	-	T	N	8,5	T
TPM1	E96V	D	D	D	D	D	D	D	D	33,0	D
TRPM4	R250C	D	D	D	D	D	M	T	D	29,40	D
TRPM4	W525X	-	-	-	-	D	-	-	-	28,50	-
TRPM4	L901P	D.	-	-	-	D	-	-	D.	28,50	-

Ген	Замена	Используемая биоинформатическая программа расчета									
		SIFT	Polyphen2 HDIV	Polyphen2 HVAR	LRT <sup>1</sup>	Mutation Taster	Mutation Assessor	FATHMM	PROVEA N	CAD	Meta SV
TTN	R34840Q	D	D	D	-	D	N	T	D	24,50	D
TTN	Q33928R	D	T	T	-	D	L	T	T	16,38	T
TTN	A32765G	D	D	D	-	D	L	T	D	21,70	T
TTN	R32748C	D	D	D	-	D	M	T	D	23,40	T
TTN	S30695P	D	D	D	-	D	M	T	D	22,00	D
TTN	V29487M	D	P	T	-	D	N	T	T	15,35	T
TTN	R28821Q	T	D	D	-	D	M	T	D	25,6	T
TTN	T27535A	T	P	P	-	D	L	T	D	13,49	T
TTN	G26298R	T	D	P	-	D	L	T	D	21,60	T
TTN	S24535Y	D	D	D	-	D	M	T	D	20,50	T
TTN	T23253I	D	D	D	-	D	M	T	D	15,22	D
TTN	A22820P	D	D	D	-	D	H	T	D	22,20	D
TTN	D22314Y	D	D	D	-	D	M	T	D	21,70	T
TTN	E20241Q	D	D	D	-	D	M	T	T	15,37	T
TTN	L17212F	D	D	D	-	D	H	D	D	19,64	D
TTN	S15861N	D	D	D	-	D	M	T	T	21,40	T
TTN	P13156T	D	P	P	-	D	M	T	D	15,93	T
TTN	P12337S	-	-	-	-	T	-	T	-	7,93	-
TTN	H10092Y	T	T	T	-	T	L	T	D	21,20	T
TTN	T8302K	T	B	B	-	D	-	T	N	17,24	T
TTN	D7462E	T	D	P	-	T	L	T	T	10,46	T
TTN	N6822S	T	T	T	-	T	L	T	T	5,14	T
TTN	Q5957H	D	P	P	-	T	L	T	D	5,85	T
TTN	D5516Y	D	D	D	-	D	M	D	D	14,94	D
TTN	A3896V	T	T	T	-	T	N	T	T	18,12	T
TTN	V3319I	T	T	T	-	T	L	T	T	14,99	T
TTN	R3120Q	T	D	P	-	D	L	T	T	23,70	T
TTN	R2083I	D	P	P	-	D	L	T	D	14,85	T
TTN	P12337S	-	-	-	-	T	-	T	-	7,93	-
VCL	H636R	T	D	D	D	D	M	T	D	23,90	T

Кроме того, у каждого пациента в отдельности был проанализирован ряд редких SNP с популяционной частотой 1:1000 — 1:10 000, что выявило дополнительные 40 генетических вариантов (Таблица 15). Как и ожидалось, наибольшее число вариантов также было найдено в гене тайтина *TTN* ( $n = 15$ ). Редких полиморфизмов не было обнаружено в группе саркомерных генов белков или митохондриальных генов. В отличие от этого, количество вариантов в генах белков десмосом и генах, кодирующих мембрана-ассоциированные белки, составляло 75% с учетом вариантов в гене тайтина и 38% без учета последних.

Таблица 15 — Перечень редких вариантов с частотой 1:1000 — 1:10 000, обнаруженных в группе РКМП методом секвенирования нового поколения при использовании целевой панели из 108 генов

Пациент	Ген	rs	Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предполагаемый функц. эффект
1	<i>TTN</i>	rs200899806	V29487M	0,07	T
2	<i>TTN</i>	rs181067357	Q5957H	0,02	T
3	<i>PDLIM3</i>	rs143812960	S299N	0,01	T
	<i>ILK</i>	rs200336608	L53M	0,04	D
	<i>TTN</i>	rs183482849	D7462E	0,01	T
	<i>TTN</i>	rs72648940	D5516Y	0,05	D
4	<i>VCL</i>	rs71579374	H636R	0,09	T
	<i>HCN4</i>	rs200507617	E1193Q	0,08	D
	<i>TTN</i>	rs72648273	A32765G	0,09	T
5	<i>KCNH2</i>	rs199473025	L1045F	0,03	D
	<i>SCN5A</i>	rs45489199	P2006A	0,003	T
6	<i>TTN</i>	rs72648205	G26298R	0,03	T
7	<i>CACNA1C</i>	rs201777030	T1953M	0,05	T
8	<i>TRPM4</i>	rs71352737	W525X	0,09	–
	<i>MYOM1</i>	rs554996810	P396S	0,006	T
9	<i>CACNA1C</i>	rs369423529	1113+7A>G	0,02	–
	<i>TTN</i>	rs200212521	E20241Q	0,09	T
10	<i>ANK2</i>	rs192761999	S2064T	0,02	T
	<i>EYA4</i>	rs144415484	D327N	0,05	T
	<i>TMEM43</i>	rs367910936	R240C	0,02	T
12	<i>ILK</i>	rs140322345	R211C	0,09	D
	<i>JPH2</i>	rs144022614	T286A	0,09	T
15	<i>TRPM4</i>	rs144208673	R250C	0,05	D
	<i>TTN</i>	rs72646880	A22820P	0,09	D
16	<i>TTN</i>	rs72648272	R32748C	0,09	T
	<i>TTN</i>	rs72650011	H10092Y	0,09	T
	<i>TTN</i>	rs72647894	R3120Q	0,09	T
18	<i>CACNA1C</i>	rs201492706	A1736G	0,08	T



Пациент	Ген	rs	Аминокислотная замена	MAF% GnomAd	Предполагаемый функц. эффект
	TTN	rs201804005	S24535Y	0,04	T
19	NEBL	rs147622517	Y89X	0,09	–
21	ANK2	rs201628725	Q2048R	0,008	T
	MYPN	rs185841477	D221V	0,005	T
	TTN	rs72650064	P13156T	0,06	T
22	SYNE1	rs139834542	L8619P	0,09	D
23	MIR548N;TTN	rs587782987	–	0,01	–
24	TMPO	rs139700737	R274K	0,09	T
27	AKAP9	rs138161478	V367M	0,03	T
32	TTN	rs192152102	R28291C	0,07	T
34	TTN	rs370696020	F17119V	0,008	T
35	TRPM4	rs144421653	L901P	0,01	D

T (Tolerated) — нейтральный предсказанный структурный эффект замены; D (Damaging) — патогенный предсказанный структурный эффект замены.

Для исключения вероятности того, что обнаруженный спектр генетических вариантов является случайным и не представляет собой характерный для РКМП набор генетических вариантов, было проведено секвенирование ДНК 10 пациентов с другой патологией сердечно-сосудистой системы — идиопатическими желудочковыми нарушениями ритма с дебютом в раннем возрасте без признаков ИБС и структурных аномалий сердца по данным коронарографии и эхокардиографии. Секвенирование проводилось с использованием той же целевой панели, что и при исследовании ДНК пациентов с РКМП. В данной группе пациентов с учетом раннего возраста начала заболевания (желудочковая тахикардия) и отсутствия структурных нарушений миокарда по данным ЭхоКГ врожденный генетически обусловленный характер патологии представляется наиболее вероятным. В данной группе из 10 пациентов мы выявили 14 патогенных или вероятно-патогенных вариантов в генах ионных каналов (Таблица 16). В генах, кодирующих белки саркомера и цитоскелета, патогенных или вероятно-патогенных генетических вариантов обнаружено не было. Таким образом, идентифицированный спектр генетических причин РКМП не представляет собой случайную комбинацию генетических вариантов и отличается от спектра причин при других генетически обусловленных заболеваниях.

Таблица 16 — Список патогенных, вероятно-патогенных вариантов и вариантов неизвестной значимости у пациентов с идиопатическими нарушениями ритма при использовании метода целевого секвенирования с применением панели из 108 генов

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты					Варианты неопределенной значимости			
	Категория мутации	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd
1	ВП	KCNH2	chr7:150649941:C>A NM_172056: V377F	—	—	TRPM4	rs14132752 2	chr2:179428256:T>C NM_017636:T27535 A	0,02
2	П	PKP2	chr12: 33031955:G>A NM_004572: R79X	rs12143442 0	0,0004	TTN	rs150820403	chr2:179615320 C>T NM_133379: R3936Q	0,02
3	ВП	DSP	chr:6 7579723:C>G NM_004415:C1100 W	—	—	KCNH2	rs199473025	chr7: 150644435 G>A. NM_172056:L1045F	0,1
						TTN	rs150820403	chr2: 179426551 T>A. NM_133379:H28103 L	0,02
4	—	—	—	—	—	SNTA1	rs199964677	chr20:32026755:A>G NM_003098: F130L	0,002
						BAG3	rs78439745	chr10:121432157:G> A NM_004281:D300N	0,08
5	П	RYR2	chr1: 237972213:G>A NM_001035: V477II	rs79472880 4	—	TTN	rs202187398	chr2: 179411522 G>A NM_133379:H28103 L	0,02
						TTN	rs201437752	chr2: 179426551 C>T. NM_133379: D27966V	0,08

Пациент	Патогенные и вероятно-патогенные варианты					Варианты неопределенной значимости			
	Категория мутации	Ген	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	rs	MAF% GnomAd	Ген	rs	Позиция GRCh37 Аминокислотная замена	MAF% GnomAd
6	П	RYR2	chr1: 237995919:G>A NM_001035: R4959Q	rs79472881 1	–	CASQ	rs146333579	chr1: 116280896:T>C NM_024422:D317E	0,04
						TTN	rs146181116	chr2:179629287:C>T. NM_001267550: S29465F	0,004
7	П	KCNQ1	chr11:2604759:T>C NM_181798:F212S	rs19947275 9	–	AKAP9	–	chr7: 91630514:G>A. NM_147185:R428K	–
						AKAP9	rs551807012	chr7: 91700295:G>A NM_147185:R2187Q	0,3
8	–	–	–	–	–	CASQ2	–	chr1: 116245573: 974_983del NM_001232:D325fs	–
						CASQ2	–	chr7: 116287460:G>T NM_001232: A103D	–
9	П	KCNQ1	chr11: 2549249: 96+1G>A NM_181798:del ex.2	rs76281487 9	0,0008	NEBL	–	chr10: 21108436:T>C NM_006393.2:K658E	–
						AKAP9	rs754487282	chr7: 91714807:A>C NM_147185: 8809- 2A>C	0,001
10	–	–	–	–	–	CACNA1C	–	chr12: 2702421:G>A NM_199460: R858H	–

П — патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG; ВП — вероятно-патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG.

В дополнение в исследуемой группе пациентов были проанализированы SNP, встречающиеся в популяции с частотой 1:100 — 1:1000 в соответствии с базами данных GnomAd и ExAC. В 7 из 108 генов было выявлено 11 SNP, которые с достоверно более высокой частотой встречались у пациентов с РКМП по сравнению с данными GnomAd и ExAC (Таблица 17). Обращает на себя внимание то, что данные варианты также находились в генах, кодирующих преимущественно структурные белки, белки области Z-дисков и мембранно-ассоциированные ионные каналы.

Таблица 17 — SNP достоверно чаще встречающиеся в группе пациентов с РКМП по сравнению с контрольной популяцией по данным GnomAd и ExAC

Ген	Аминокислотная замена	rs	Пациенты	MAF GnomAd	p
FKTN	N446D	rs41313301	1, 18, 22, 23	0,01	9.8E-16
ANK2	I3285T	rs36210417	4, 18, 31, 33,	0,008	1.4E-21
ANK2	S3300R	rs34270799	6, 10	0,019	0.02
RYR2	A1136V	rs72549415	14, 16, 32	0,007	3.5E-15
MYOM1	S47G	rs202145133	5, 9	0,007	7.7E-7
DMD	K1387R	rs72468638	5, 23	0,006	2.8E-08
RANGRF	E61X	rs140704891	9, 15, 17	0,004	5.2E-27
TTN	T21008I	rs72646850	15, 16, 24	0,009	1.4E-11
TTN	I17731T	rs72646809	3, 4	0,01	0.0018
TTN	P12337S	rs201474544	1, 12	0,017	0.01
TTN	C5387Y	rs72648913	4, 9	0,003	1.1E-16

#### 4.3. Моделирование основных белковых взаимодействий и сигнальных связей, ассоциированных с РКМП

Для более полного раскрытия структурных и функциональных взаимосвязей генов, мутации в которых ассоциированы с РКМП, было проведено биоинформатическое моделирование с использованием 38 белков, выявленных в результате биоинформатического анализа результатов целевого секвенирования.

Список данных белков был также дополнен 30 взаимодействующими с ними белками (Рисунок 18).

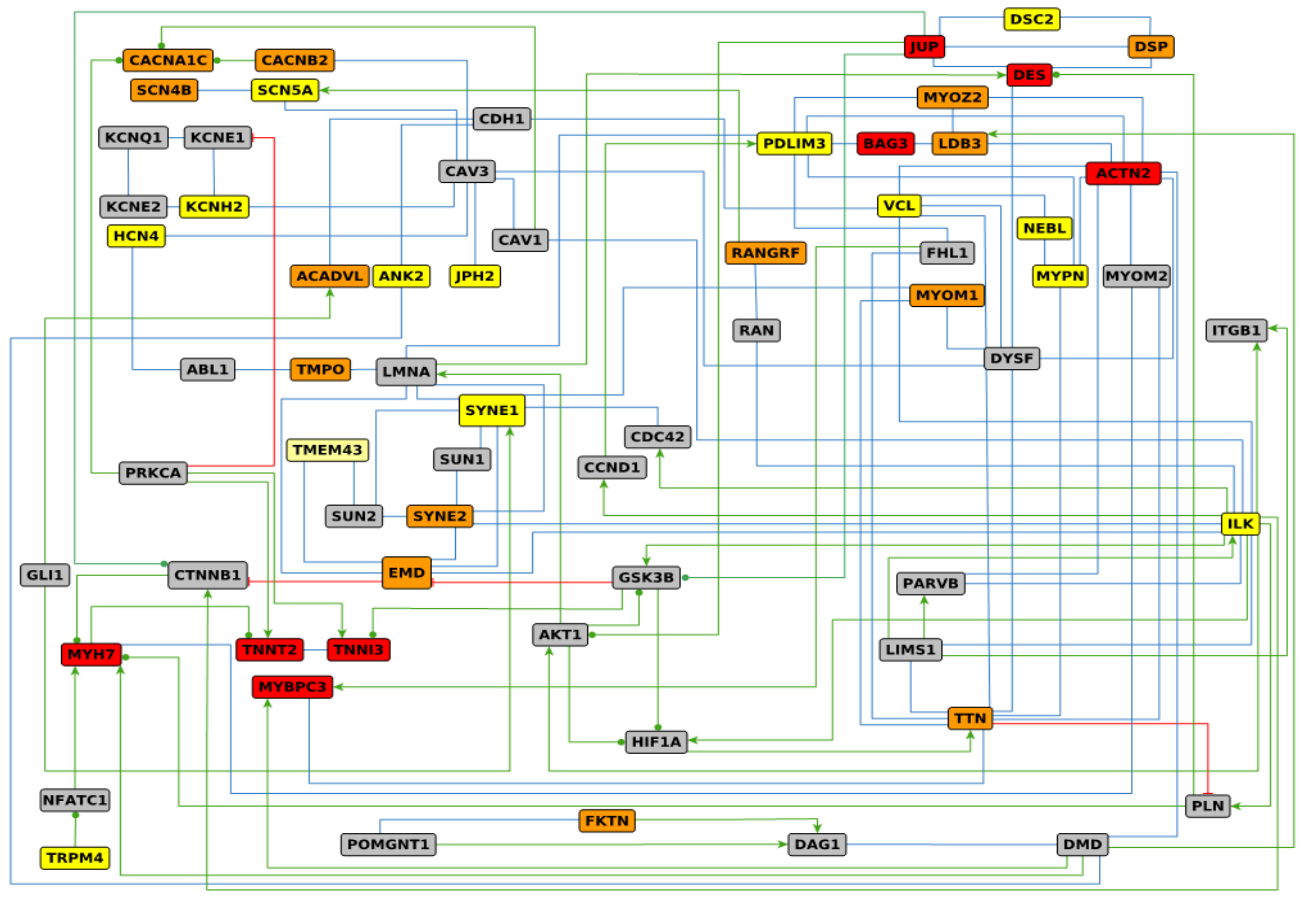


Рисунок 18 — Сеть взаимодействий между белками, в генах которых были обнаружены различные генетические варианты, ассоциированные с РКМП.

Белки, в которых были обнаружены патогенные и вероятно-патогенные варианты, обозначены красным цветом, варианты неопределенной значимости — оранжевым, редкие SNP — желтым. Белки, опосредующие межбелковые взаимодействия, но в которых не были обнаружены генетические варианты, обозначены серым цветом. Активирующее влияние обозначено зелеными линиями со стрелками, ингибирующее — красными линиями с перекладиной, модулирующее действие — зелеными линиями с кругом, прямое структурное взаимодействие — голубыми линиями

В итоге анализ проводили с использованием 68 белков, связанных друг с другом 124 структурными и функциональными взаимодействиями. Из этих взаимодействий 38 и 33 были ранее описаны как характерные для мышечных и миокардиальных клеток, соответственно. Большинство из отобранных 67 белков принадлежат к одной из 4 функциональных групп: белки наружной мембраны митохондрий, механочувствительные белки структуры Z-дисков, белки ядерной мембраны и белки структуры саркомера. Одним из белков с наибольшим количеством выявленных структурных и функциональных взаимодействий является белок ILK, имеющий связи с 16 другими белками. В частности, мы продемонстрировали структурные взаимодействия ILK с белком ядерной мембраны несприном SYNE2, а также белками мембранного комплекса VCL и LIMS1 (PINCH1) и регуляторными белками AKT1, GSK3B, CDC42, ITGB и PLN.

#### **4.4. Анализ влияния патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе пациентов с РКМП на клиническое течение заболевания**

Общая безтрансплантационная выживаемость в период всего срока наблюдения не отличалась между пациентами с патогенными и вероятно-патогенными вариантами в генах саркомерных и цитоскелетных генов. Не было выявлено различия при сравнении кривых дожития между носителями патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных и цитоскелетных генах как в общей группе, так и в группе пациентов с дебютом до и после 18 лет (Рисунок 19а, б, в). При более детальном анализе данного наблюдения было показано, что в группе пациентов с дебютом заболевания до 18 лет пятилетняя безтрансплантационная выживаемость среди пациентов с патогенными и вероятно-патогенными вариантами в группе саркомерных генов составляла 33,3%, а в группе цитоскелетных генов — 70% (Рисунок 19в). В то время как в группе пациентов с дебютом во взрослом возрасте данного отличия не наблюдалось. Сравнение кривых десятилетнего дожития пациентов с полным наблюдением в двух группах с наличием патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных и

цитоскелетных генах выявило значимое различие с неблагоприятным течением заболевания у носителей саркомерных вариантов ( $p = 0,047$ ) (Рисунок 19г). При этом во всех случаях достижение конечной точки в группе пациентов с саркомерными вариантами наблюдалось в течение первых пяти лет заболевания.

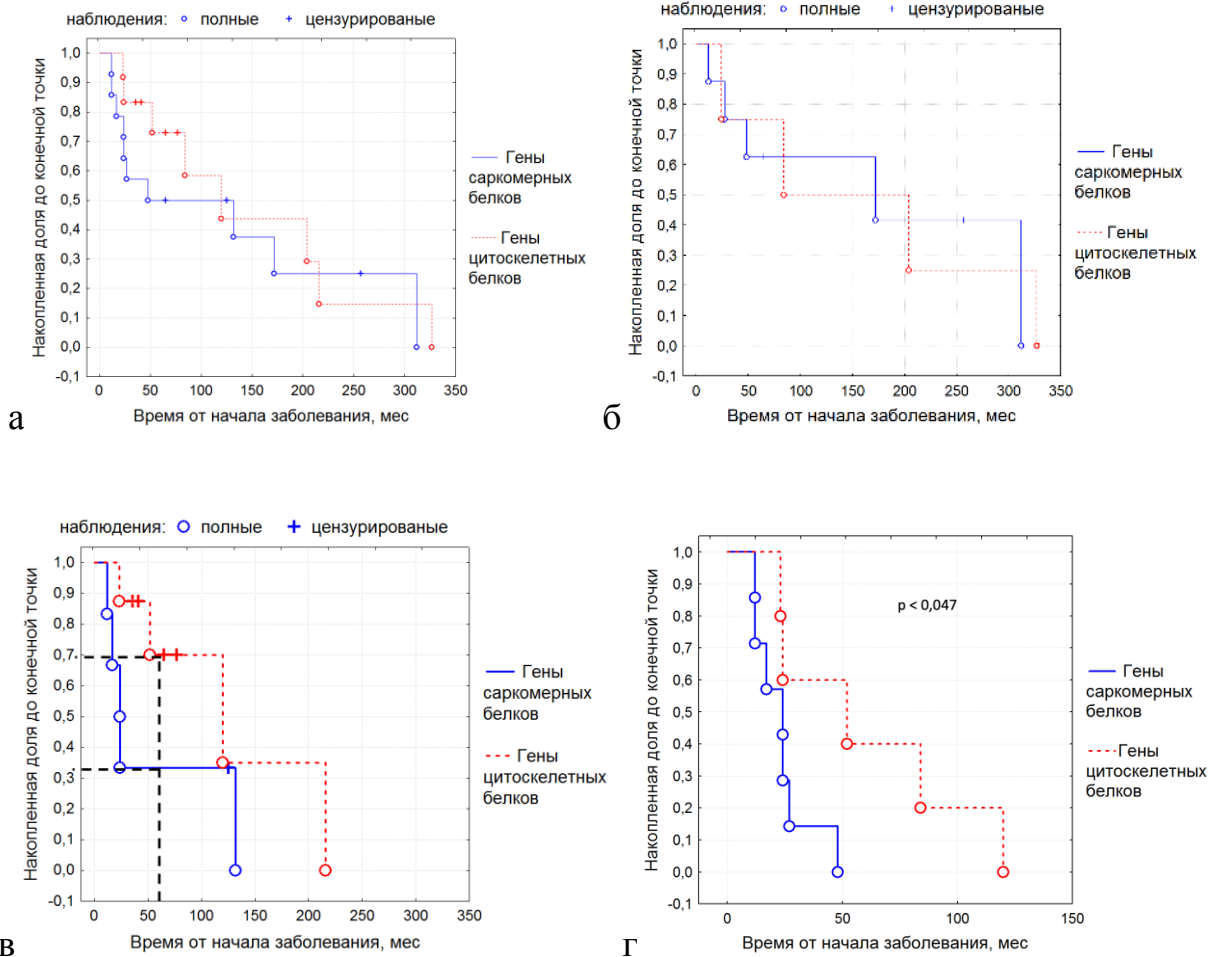


Рисунок 19 — Кривые дожития пациентов в зависимости от характера выявленных мутаций:

- (а) — наличие патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов;  
 (б) — то же при дебюте заболевания после 18 лет; (в) — то же при дебюте заболевания до 18 лет; (г) — сравнение кривых десятилетнего дожития пациентов двух групп с наличием патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов с полным наблюдением ( $p < 0,047$ , тест Кокса–Мантеля)

Среди пациентов, у которых наблюдалась трансформация рестриктивного фенотипа в гипертрофический с формированием ГКМП с рестриктивным фенотипом (пациенты 2, 14, 15), а также у родственников которых наблюдалась ГКМП (пациенты 6, 17, 18), в 80% случае причиной заболевания были патогенные и вероятно-патогенные варианты в саркомерных генах. Летальные исходы вследствие синдрома ВС (пациенты 3, 5, 14, 28, 30) также наблюдались исключительно в группе с вариантами в саркомерных генах.

Таким образом, причинный генотип пациента вносит наибольший вклад в течение РКМП в первые десять лет после появления клинической картины заболевания и преимущественно в группе пациентов с дебютом заболевания в детском возрасте. В данной группе наихудший прогноз наблюдается среди пациентов с причинными вариантами в саркомерных генах и связан в основном с развитием синдрома ВС. Наличие патогенных и вероятно-патогенных вариантов в саркомерных генах у всех пациентов с РКМП ассоциировано с неблагоприятным прогнозом заболевания в течение первых десяти лет. В группе пациентов с дебютом заболевания до 18 лет и причинными вариантами в цитоскелетных генах у всех пациентов отмечались признаки НМЗ, а основной причиной достижения конечной точки являлась смерть от явлений ХСН и трансплантация сердца.

Для оценки вклада генотипа пациента в риск развития неблагоприятного исхода ХСН в течение 1 года нами была повторно проведена пошаговая процедура построения ДФ в группе из 20 пациентов, для которых проводился дискриминантный анализ для оценки значимости факторов, влияющих на годовую выживаемость. Для этого к описанным выше 18 признакам был добавлен признак наличия патогенного или вероятно-патогенного варианта в генах саркомерных белков. Прямое включение его в состав ранее построенной ДФ (Таблица 12) дало небольшое изменение факторных нагрузок, но не повлияло на порядок распределения ведущих факторов (Таблица 18).



Таблица 18 — Характеристики дискриминантной функции (ДФ) для 9 признаков

Признаки	Коэффициенты ДФ	Факторные нагрузки
Функц. класс ХСН	-0,897	-0,201
ФВ	0,161	0,166
ФП	-4,758	-0,089
Креатинин	-0,072	-0,073
К-сберегающие диуретики	-0,082	-0,063
ИАПФ	2,215	0,049
Возраст	0,153	-0,040
Гены саркомерных белков	-2,676	0,033
Лимфоциты, %	-0,415	-0,020
Константа	12,3	-

В таблице признаки упорядочены по абсолютной величине их факторных нагрузок.

## **Глава 5. ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ РКМП В СОЧЕТАНИИ С ПРИЗНАКАМИ ПОРАЖЕНИЯ НЕЙРОМЫШЕЧНОЙ СИСТЕМЫ**

Среди 35 пациентов с РКМП у 10 при клиническом обследовании или сборе анамнеза обнаруживались признаки нейромышечной патологии, которые проявлялись мышечной слабостью, повышением уровня общей фракции КФК, мышечной гипотонией при объективном обследовании, слабостью мышц верхнего или нижнего плечевого пояса. В группе пациентов с дебютом в детском возрасте в качестве проявлений нейромышечной патологии также рассматривались мышечные дисторсии, артрогрипоз и камптодактилия. У 5 из 10 пациентов признаки миопатии были подтверждены нейрмиографией. Поскольку наличие нейромышечной симптоматики во многом может определять прогноз и врачебную тактику в отношении пациентов с кардиомиопатиями, при обработке клинических и генетических данных эта группа пациентов была проанализирована более углубленно. Алгоритм генетического анализа поиска причинных мутаций в группе пациентов с РКМП и проявлениями нейромышечной патологии представлен на Рисунке 20. Генетическое обследование при помощи секвенирования нового поколения с использованием целевой панели генов позволило выявить генетическую природу заболевания у 2 из 11 пациентов. В этих случаях причинными генами являлись ген десмина (*DES*) и ген *BAG3*, выявленные генетические варианты в которых соответствовали критериям патогенности по классификации ACMG. Для обоих генов ранее были описаны случаи развития кардиомиопатии, в частности РКМП, в сочетании с нейромышечной патологией.



Рисунок 20 — Алгоритм генетического анализ поиска причинных мутаций в группе пациентов с РКМП и проявлениями нейромышечной патологии

У девяти пациентов с признаками нейромышечной патологии в качестве следующего этапа было проведено полноэкзомное секвенирование. В результате у 6 пациентов были выявлены варианты в гене филамина С (*FLNC*), которые были классифицированы как патогенные или вероятно-патогенные, у одного пациента был выявлен новый ранее не описанный вариант в гене *СМУА5*, классифицированный как вариант неопределенной значимости, у одного пациента не было обнаружено новых патогенных, вероятно-патогенных вариантов или вариантов неопределенной значимости в дополнение к результатам целевого секвенирования. Клиническая характеристика нейромышечного фенотипа и перечень выявленных генетических вариантов представлены в Таблице 19.

Таблица 19 — Список патогенных, вероятно-патогенных вариантов и вариантов неопределенной значимости у пациентов с РКМП и нейромышечным фенотипом

Пациент	Ген	Позиция и аминокислотная замена по GRCh37	Категория по классификации ACMG	Возраст дебюта РКМП	Проявления со стороны нейромышечной системы
1	BAG3 TTN MYOM1	chr10:121431885:C>T NM_004281: <b>P209L</b> chr2:179428256:T>C NM_001267550: <b>T27535A</b> chr18:3085111:C>T NM_003803: <b>G1424E</b>	П НЗ НЗ	16 лет	КФК ↑×1,2, признаки миопатии по данным ЭМГ
19	DES	chr:2:220285069:G>A NM_001927:c.735+1G>A	П	15 лет	КФК ↑×1,5, признаки миопатии по данным ЭМГ, дистальная миопатия
15	FLNC TTN	Chr7:1284850667:GC>CT NM_001458: <b>A1183L</b> chr2:179441101:G>A NM_001267550: <b>T23253I</b>	П НЗ	6 мес.	Гипотония, слабость мышц пояса нижних конечностей, дистопия тазобедренного сустава и артрогрипоз при рождении, КФК на верхней границе нормы, ЛДГ ↑×1,3
16	FLNC	Chr7: 128485076:C>T NM_001458: <b>A1186V</b>	П	3 года	Слабость мышц пояса нижних конечностей, мышечные атрофии, КФК на верхней границе нормы, ЛДГ ↑×1,1
22	FLNC TTN	Chr7: 128485076:C>T NM_001458: <b>A1186V</b> chr:2:179414366:A>G NM_001267550: <b>S30695P</b>	П НЗ	8 лет	Артрогрипоз, сколиоз, дистальная миопатия
25	FLNC	Chr7: 128485076:C>T NM_001458: <b>A1186V</b>	П	1 год	Артрогрипоз, сколиоз, слабость мышц пояса нижних конечностей, КФК ↑×1,2
26	FLNC	Chr7: 1128494628:G>A NM_001458: <b>V2297V</b>	П	4 года	ЛДГ ↑×1,1, мышечная кривошея
31	FLNC	Chr7:128489034:4926_4927 del NM_001458: <b>T1642fs</b>	ВП	2 года	Камптодактилия, ЛДГ ↑×1,5, дистопия тазобедренного сустава
27	CMYA5	Chr5: 79026636:A>G NM_153610: <b>E683G</b>	НЗ	3 года	Аутизм, мышечная слабость, гипотония, признаки миопатии по данным ЭМГ

Пациент	Ген	Позиция и аминокислотная замена по GRCh37	Категория по классификации ACMG	Возраст дебюта РКМП	Проявления со стороны нейромышечной системы
18	SYNE2	chr14:64692150:C>T	НЗ	11 лет	Диффузная мышечная слабость, признаки миопатии по данным ЭМГ
	DSP	NM_182914:S6877F	НЗ		
	TTN	chr6:7580808:G>T NM_004415:S1462I chr2:179482230:C>T NM_001267550:S15861N	НЗ		

П — патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG; ВП — вероятно-патогенный вариант в соответствии с классификацией ACMG; НЗ — вариант неопределенной значимости в соответствии с классификацией ACMG; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ЭМГ — электромиография; КФК — креатинфосфокиназа.

Ниже приводится детальный клинический анализ случаев сочетания РКМП с нейромышечной патологией.

### 5.1. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене *DES*

Пациент 16 лет был госпитализирован впервые для кардиологического обследования в связи со значимым увеличением размеров левого предсердия, которое было случайно выявлено во время планового флюорографического обследования. На момент обследования пациент не предъявлял жалоб, вел активный образ жизни с обычным уровнем физических нагрузок, регулярно занимался непрофессиональным спортом. При эхокардиографическом обследовании были выявлены признаки гипертрофии левого желудочка, признаки диастолической дисфункции при сохранной фракции выброса левого желудочка и отсутствии перикардального выпота (Таблица 20). При электрокардиографическом исследовании определялась преходящая синоатриальная блокада I степени, клинический и биохимический анализы крови не выявили отклонений, неврологическое обследование в данный момент времени не было проведено. При сборе семейного анамнеза был выявлен случай ВС у деда по материнской линии в возрасте 63 лет. Пациенту был поставлен диагноз идиопатической

необструктивной ГКМП, назначен регулярный прием бета-адреноблокаторов и даны рекомендации относительно ограничения занятий спортом.

Таблица 20 — Динамика эхокардиографических данных у пациента с десминовой кардиомиопатией

Возраст	16 лет	20 лет	23 лет	27 лет
МЖПд, мм	17	15	13	11
ЗСЛЖд, мм	16	13	12	10
КДРЛЖ, мм	43	46	51	54
ЛП, мм	38	46	50	60
ФВ, %	66	60	67	50

МЖПд — толщина межжелудочковой перегородки в диастолу; ЗСЛЖд — задняя стенка левого желудочка в диастолу; КДРЛЖ — конечно-диастолический размер левого желудочка в диастолу; ЛП — левое предсердие, ФВ — фракция выброса левого желудочка.

В течение следующих семи лет пациент не предъявлял жалоб и самостоятельно отменил прием бета-адреноблокаторов. В возрасте 24 лет у него появились жалобы на частые сердцебиения и одышку при незначительной физической нагрузке, которые значительно ограничивали его физическую активность. Во время госпитализации при ЭхоКГ было выявлено незначительное увеличение толщины стенки левого желудочка (13 мм), увеличение левого предсердия и умеренный перикардиальный выпот (расхождение листков перикарда 4–10 мм, приблизительный объем выпота 300 мл). Пациенту был поставлен диагноз РКМП, ХСН и повторно назначена терапия бета-адреноблокаторами и мочегонными средствами. В возрасте 27 лет после эпизода ОРВИ впервые появились жалобы на синкопальные состояния и значительно снизилась толерантность к физической нагрузке. В то же время появились жалобы на трудности при ходьбе, ощущение мышечной слабости и усталости, однако данные жалобы были расценены как проявления сердечной недостаточности и пациент был повторно госпитализирован. При холтеровском мониторировании ЭКГ были выявлены частые желудочковые экстрасистолы, эпизоды желудочковой тахикардии и атриовентрикулярной блокады II степени. Сывороточные маркеры болезней соединительной ткани и болезни Лайма были отрицательны, но отмечался

постоянно повышенный уровень тропонина (0,860–1,850), а также умеренное повышение КФК<sub>общ.</sub>. При МРТ сердца выявлялся феномен позднего контрастирования в области межжелудочковой перегородки. В связи с прогрессирующими дефектами АВ проводимости и желудочковыми нарушениями ритма пациенту был имплантирован ИКД и выполнена эндомикардиальная биопсия. При морфологическом исследовании миокарда обнаруживался умеренный мелкофокусный феномен дисконкомплексации кардиомиоцитов, вариабельность величины и формы кардиомиоцитов, часто с признаками фрагментации (Рисунок 21).

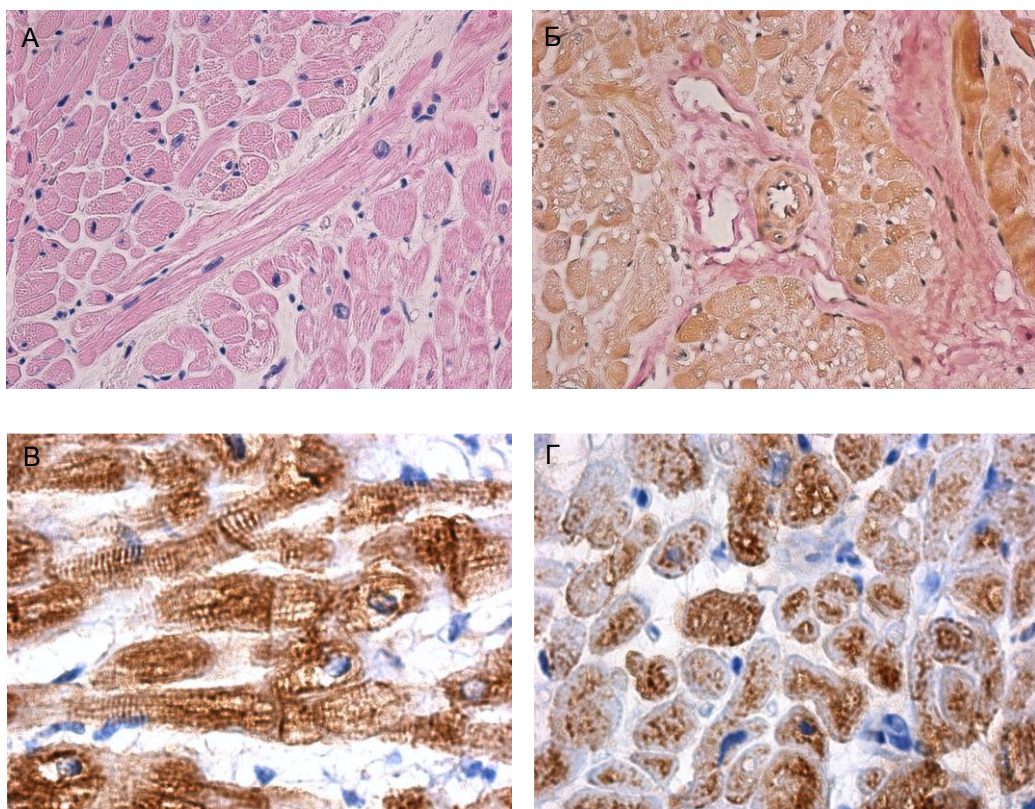


Рисунок 21 — Морфологическое исследование биоптата, полученного при эндомикардиальной биопсии у пациента с десминовой кардиомиопатией (окрашивание гематоксилином и эозином,  $\times 40$ ):

(а) — вариабельность размера и формы кардиомиоцитов; (б) — участки периваскулярного фиброза, пролиферация гладкомышечных клеток (окраска по Ван Гизону,  $\times 40$ ); (в, г) — окрашивание с применением антител к десмину. Нерегулярность поперечного исчерчивания, нарушение целостности Z-линий, очаги вакуолизации и отсутствия специфического окрашивания ( $\times 100$ )

Отмечалась значительная перинуклеарная вакуолизация с оптически пустыми вакуолями, последний феномен часто сопровождался фрагментацией кардиомиоцитов, гомогенизацией цитоплазмы и ядерного матрикса. Строма миокарда характеризовалась умеренным перимиоцитарным фиброзом и мелкими очагами заместительного фиброза. Вокруг мелких артерий отмечался значительный периваскулярный фиброз наряду с гипертрофией и гиперплазией гладкомышечных клеток. При иммуногистохимическом окрашивании не обнаруживалось инфильтрации лимфоцитами, но выявлялось незначительное количество макрофагов в зонах выраженной деструкции кардиомиоцитов. Окрашивание с применением антител к десмину выявило локальное исчезновение поперечной исчерченности и неравномерное распределение окраски с областями отсутствия иммунореактивности. Вирусологическое исследование биоптатов методом ПЦР не выявило наличия кардиотропных вирусов. При проведении электромиографии у пациента были обнаружены умеренные признаки миопатического процесса с вовлечением преимущественно проксимальных мышц нижних конечностей. С учетом клинической картины заболевания (рестриктивная кардиомиопатия, АВ-блокада, повышение уровня КФК<sub>общ.</sub> и признаки проксимального миопатического процесса при ЭМГ, пациенту проводили исследование всех кодирующих экзонов генов десмина (*DES*) и ламина (*LMNA*) методом прямого двунаправленного секвенирования на аппарате ABI PRISM 3130 после выделения ДНК из лимфоцитов периферической крови методом фенол-хлороформной экстракции. В результате была обнаружена мутация с.735+1G>A (*IVS3+1G→A*) в гене десмина, отсутствующая в 300 образцах ДНК (600 наборов ДНК) здоровых доноров и базах ExAC и GnomAd (Рисунок 22).



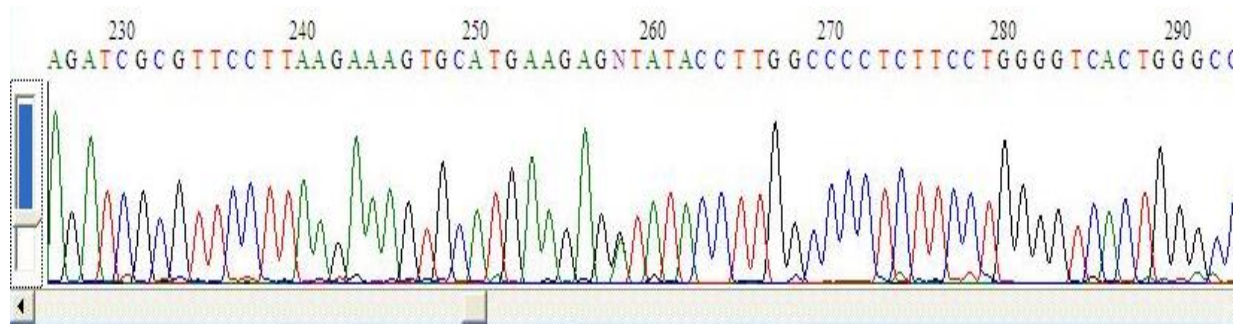


Рисунок 22 — Мутация в сплайс-сайте экзона 3:с.735+1G>A (NM\_ 001927:) гена десмина (*DES*), приводящая к потере 3 экзона

Позже пациенту также было проведено генетическое исследование методом целевого секвенирования нового поколения и подтверждено наличие единственной патогенной замены в гене десмина в качестве причинного генетического варианта.

При дальнейшем наблюдении у пациента отмечалось прогрессирование мышечной слабости, вовлечение в процесс дистальных мышц, нарушение перистальтики желудочно-кишечного тракта при отсутствии нарушения дыхания и без вовлечения в процесс диафрагмальной мышцы. В возрасте 33 лет пациент скончался при явлениях прогрессирующей ХСН.

## 5.2. РКМП, ассоциированная с мутацией в гене *BAG3*

Пациент, житель Узбекистана, впервые обратился за медицинской помощью в возрасте 16 лет в связи со слабостью, нарастанием одышки, быстрой утомляемостью при физических нагрузках. При эхокардиографическом обследовании были выявлены признаки увеличения левого предсердия (57 мм), признаки диастолической дисфункции по рестриктивному типу и отсутствие утолщения стенок левого желудочка при сохранной фракции выброса (Таблица 21). При электрокардиографическом исследовании определялась преходящая атриовентрикулярная блокада I степени (Таблица 9). Помимо этого, при обследовании привлекало внимание слабое развитие мышечной массы, гипотрофия мышц голени, расхождение лопаток и гипотрофия мышц плечевого

пояса. Также при биохимическом исследовании крови однократно было зарегистрировано незначительное увеличение уровня КФК<sub>общ</sub> (400 ед.), однако на тот момент детальное неврологическое обследование провести было невозможно. Пациенту был поставлен диагноз идиопатической рестриктивной кардиомиопатии, назначен прием диуретиков и даны рекомендации относительно регулярного клинического наблюдения.

Таблица 21 — Динамика эхокардиографических данных у пациента с кардиомиопатией, ассоциированной с мутацией в гене *BAG3*

Возраст	16 лет	18 лет	20 лет
МЖПд, мм	12	15	11
ЗСЛЖд, мм	12	13	10
КДРЛЖ, мм	43	46	54
ЛП, мм	57	58	60
ФВ, %	76	57	—

МЖПд — толщина межжелудочковой перегородки в диастолу; ЗСЛЖд — задняя стенка левого желудочка в диастолу; КДРЛЖ — конечно-диастолический размер левого желудочка в диастолу; ЛП — левое предсердие, ФВ — фракция выброса левого желудочка.

В течение последующих двух лет пациент регулярно получал терапию и не предъявлял активных жалоб на мышечную слабость, затруднение при ходьбе и подъеме по лестнице. При очередном диспансерном обследовании с учетом умеренно повышенных значений КФК<sub>общ</sub> и признаков мышечной атрофии пациенту было проведено нейромиографическое исследование. В результате были выявлены признаки умеренной миопатии и периферической нейропатии. В возрасте 20 лет у пациента появились жалобы на частые эпизоды сердцебиения, одышку и слабость при физической нагрузке. При ЭКГ была зарегистрирована постоянная форма трепетания предсердий, при ЭхоКГ — значительное увеличение размеров левого и правого предсердий.

С учетом клинической картины заболевания: рестриктивная кардиомиопатия, умеренное повышение уровня КФК<sub>общ</sub> до 300–400 ед., признаки миопатии и нейропатии, — в качестве первой линии диагностического поиска пациенту проводилось генетическое исследование генов десмина (*DES*) и ламина

(*LMNA*) методом секвенирования по Сенгеру. В исследуемых генах патологических замен обнаружено не было. На следующем этапе пациенту было проведено массовое параллельное секвенирование с целевым обогащением и анализом 108 генов, ассоциированных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы. Было выявлено несколько замен, потенциально ассоциированных с развитием заболевания (Таблица 22).

При детальном анализе выявленных вариантов с применением классификации ACMG замены в генах *TTN* и *MYO1* на данном этапе были трактованы как варианты неопределенной значимости. Принимая во внимание соответствующую клиническую картину, проявления миопатии и кардиомиопатии, а также с учетом присутствия данного варианта в базе ClinVar (NM\_004281.3(*BAG3*):c.626C>T, p.Pro209Leu), замена P209L в гене *BAG3* была трактована в качестве причинного генетического дефекта в описанном клиническом случае РКМП.

Таблица 22 — Патогенные, вероятно-патогенные варианты и варианты неопределенной значимости у пациента с РКМП, ассоциированной с геном *BAG3*

Новые генетические варианты и варианты с частотой $\leq 1:10\ 000$				
Ген	Аминокислотная замена	rs	MAF%	Эффект
<i>BAG3</i>	P209L	rs121918312	–	D
<i>TTN</i>	T27535A	–	0,07	T
<i>MYO1</i>	G1424E	rs376646252	0,002	D
Варианты с частотой 1:1000 — 1:10 000				
<i>TTN</i>	V29487M	rs200899806	0,07	T

MAF — частота встречаемости минорного аллеля.

Предсказание эффекта мутации в соответствии с MetaSVM: D — нарушающий структуру, T — переносимый, N — нейтральный. Детальный алгоритм предиктивного анализа описан в главе «Материалы и Методы».

В течение последующих 2 лет у пациента отмечалось прогрессирование сердечной недостаточности, возрастание потребности в диуретических препаратах без клинически значимого прогрессирования миопатии и нейропатии. Смерть пациента наступила в возрасте 20 лет, через 4 года после появления первых признаков заболевания, на фоне тромбоэмболии легочной артерии и развития инфаркт-пневмонии.

### 5.3. РКМП, ассоциированные с мутациями в гене *FLNC*

В 8 из 10 случаев РКМП с нейромышечной симптоматикой секвенирование нового поколения с применением целевого обогащения не выявило никаких значимых генетических вариантов, которые могли бы являться причиной развития заболевания. В связи с этим для данных пациентов на следующем этапе было проведено полноэкзомное секвенирование с применением системы экзомного обогащения SureSelectXT на приборе Illumina HiSeq. Для 95% исследованных последовательностей покрытие составляло не менее 10 прочтений, 92% последовательностей имело как минимум 20 прочтений. При анализе данных учитывались варианты с частотой минорного аллеля менее 0,01% ( $MAF \leq 0,01\%$ ,  $\leq 1:10\ 000$ ), либо отсутствующие в общедоступных базах данных GnomAd и ExAC0.2. Вновь выявленные варианты классифицировались в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики [342] для интерпретации причинной роли генетических вариантов.

В результате проведения полноэкзомного секвенирования у 6 пациентов были выявлены 4 варианта в гене *FLNC*, которые потенциально могли бы являться причинными в развитии РКМП (пациенты 15, 16, 22, 25, 26 и 31), (Таблица 19). Все выявленные варианты в гене *FLNC* соответствовали критериям патогенных и вероятно-патогенных с учетом рекомендаций ACMG.

Детальный клинический анализ выявил, что случаи, ассоциированные с мутациями в гене *FLNC*, имеют ряд сходных клинических проявлений заболевания:

дебют РКМП в раннем детском возрасте, умеренные признаки миопатии без значимого прогрессирования, незначительно повышенные значения  $KFK_{общ}$ .

#### Клинический случай 1 (Таблица 19, пациент 15)

Пациентка 6 месяцев была впервые обследована в связи с наличием шума в области сердца, слабостью, вялостью, замедленными темпами набора веса. При обследовании были выявлены признаки увеличения левого предсердия и повышение давления в легочной артерии при сохранной фракции выброса и незначительно утолщенных стенках миокарда левого желудочка. В течение последующих 5 лет пациентка наблюдалась с диагнозом РКМП с последующей трансформацией в ГКМП с выраженным рестриктивным фенотипом. Помимо признаков сердечной недостаточности привлекало внимание наличие выраженных признаков гипотонии, мышечной слабости, затруднения при вставании с корточек. При рождении отмечались явления артрогрипоза, которые затем сменились гипотонией и мышечной атрофией. При проведении нейромиографии значимых миогенных нарушений выявлено не было. Интеллектуальное развитие незначительно отставало соответственно степени тяжести основного заболевания и ограничений социальной активности. Генетическое обследование выявило замены A1183P и A1183V в гене *FLNC* в цис-состоянии, которые отсутствовали у матери пациентки (Рисунок 23). Генетическое обследование отца не проводилось, поэтому достоверно судить о *de novo* характере выявленной мутации не представляется возможным.

#### Клинический случай 2 (Таблица 19, пациент 16)

Пациентка была впервые обследована в возрасте 3 лет в связи со слабостью, вялостью, замедленными темпами набора веса, отставанием в психомоторном развитии. Выявленные при ЭКГ признаки увеличения левого предсердия послужили причиной проведения ЭхоКГ, при которой были выявлены признаки РКМП. При комплексном обследовании ярко выраженных признаков нейромышечного заболевания обнаружено не было, уровень  $KFK_{общ}$  соответствовал норме, в связи с чем нейромиография не проводилась. После выявления замены A1186V в гене *FLNC* пациентке было проведено более

детальное неврологическое обследование, и верифицированы гипотония, мышечная слабость, затруднение при вставании с корточек и незначительная атрофия мышц нижних конечностей, которые ранее были расценены как проявления синдрома сердечной недостаточности. Родители пациентки отказались от проведения генетического исследования, поэтому о характере мутации (*de novo* или наследуемая от родителей) достоверно судить не представляется возможным.

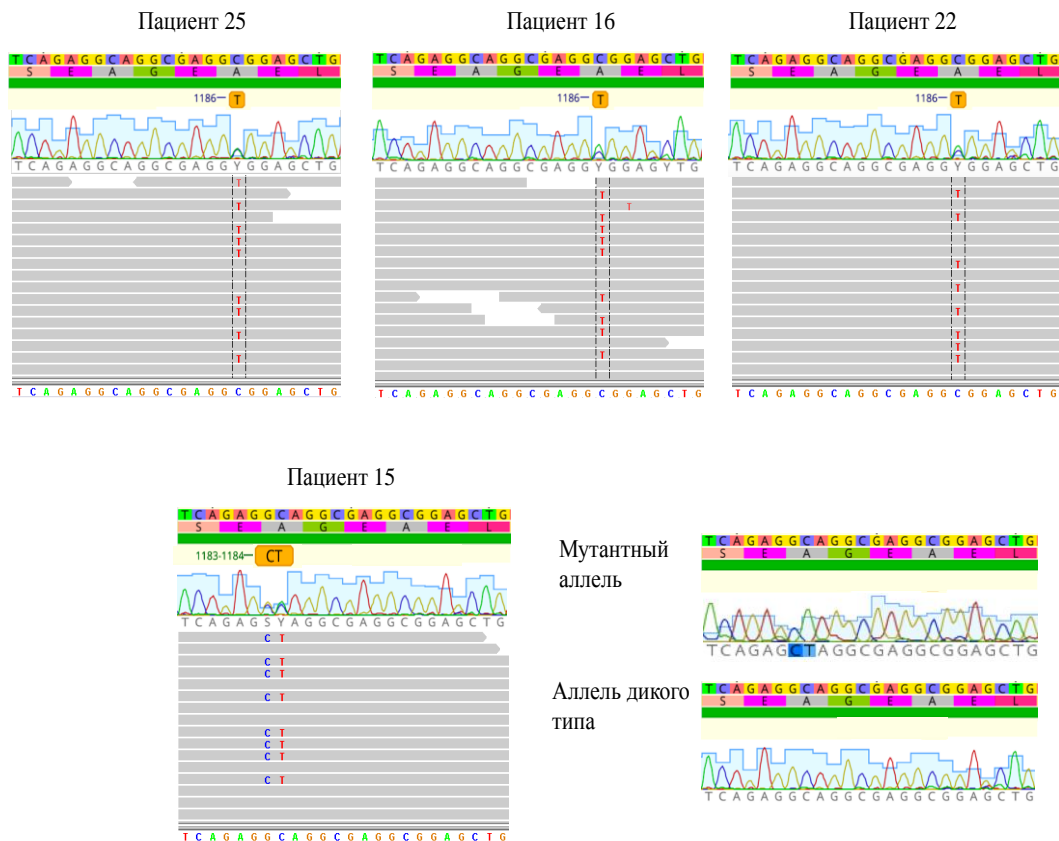


Рисунок 23 — Идентификация A1186V варианта в гене *FLNC* у пациентов детской группы с РКМП

### Клинический случай 3 (Таблица 19, пациент 22)

Пациент с рождения наблюдался неврологом в связи с врожденным артрогрипозом и незначительной мышечной слабостью без идентификации четкой неврологической патологии. Впервые обследован кардиологом в возрасте 8 лет в связи с одышкой, слабостью и утомляемостью. При эхокардиографическом обследовании были выявлены признаки РКМП. В течение 10 лет отмечалось прогрессирование признаков застойной сердечной недостаточности, повышение

КФК<sub>общ</sub> до 350 (норма  $\leq 200$ ) и отсутствие признаков прогрессирования миопатии. Мышечная слабость и явления мышечной атрофии не являлись причиной инвалидизации пациента. В возрасте 18 лет пациенту была проведена трансплантация сердца в связи с нарастающими явлениями сердечной недостаточности. Генетическое обследование родителей не выявило носительство данного генетического варианта, в связи с чем можно судить о *de novo* характере выявленной мутации.

#### Клинический случай 4 (Таблица 19, пациент 25)

Пациент с рождения наблюдался неврологом в связи с врожденным артрогрипозом, развившимся позже гипотонией, отставанием в психомоторном развитии. При очередном проведении диспансеризации в возрасте 1 года по результатам ЭКГ были заподозрены структурные нарушения миокарда предсердий, при ЭхоКГ были подтверждены признаки РКМП. При скрининговом биохимическом исследовании было выявлено умеренное повышение КФК<sub>общ</sub> до 250–450 (норма  $\leq 200$ ), ЛДГ до 320 (норма  $\leq 220$ ) и КФК<sub>МБ</sub> до 85 (норма  $\leq 24$ ). При неврологическом обследовании были выявлены признаки центрального тетрапареза, спастические нарушения с миоклонусом рук и ног, кифосколиоз, отсутствие нарушения функции глотания и глазодвигательных мышц, брадикинезия, гиперрефлексия, симметричное повышение рефлексов и повышение тонуса пирамидной системы. Генетическое обследование родителей не выявило носительства патогенного варианта в гене *FLNC*, в связи с чем можно судить о *de novo* характере выявленной мутации.

#### Клинический случай 6 (Таблица 19, пациент 26)

Пробанд — мальчик 10 лет, наблюдался кардиологом в связи с диагнозом РКМП с трехлетнего возраста. Известно, что при рождении диагностирована врожденная кривошея, по поводу которой в возрасте 4 лет проведено оперативное вмешательство. Из анамнеза известно, что пресинкопальных и синкопальных состояний не отмечалось, случаев ВС среди лиц молодого возраста в семье не регистрировалось, у матери пробанда имеет место пароксизмальная форма фибрилляции-трепетания предсердий с 27 лет, а также врожденная кривошея.

Впервые признаки увеличения предсердий у пробанда были выявлены при проведении ЭхоКГ в трехлетнем возрасте. Диагноз РКМП был установлен в 7 лет, когда по данным ЭхоКГ наблюдалась двусторонняя атриомегалия (правое предсердие —  $45 \times 50$  мм, левое предсердие —  $40 \times 46$  мм), симметричная гипертрофия миокарда левого желудочка (толщина стенки до 7,5 мм), трансмитральный кровоток по рестриктивному типу. При госпитализации в возрасте 9 лет при МРТ отмечалась выраженная дилатация предсердий: левое предсердие —  $49,3 \times 42,5$  мм, правое предсердие —  $52,8 \times 46,2$  мм, недостаточность трикуспидального клапана 2-й степени. Убедительных данных за диффузное поражение и полинейропатию при проведении миографии получено не было, признаки ХСН соответствовали II функциональному классу.

В результате молекулярно-генетического обследования у пробанда была обнаружена замена в гене *FLNC* [V2297M], rs1420394583 (Рисунок 24а), описанная N. Tucker как патогенная и ассоциированная в развитии семейной формы РКМП [399].

#### Клинический случай 7 (Таблица 19, пациент 31)

Пробанд — девочка 7 лет, наблюдался кардиологом в связи с диагнозом РКМП с трехлетнего возраста. Известно, что при рождении диагностирован ДМПП и аневризма межпредсердной перегородки, открытое овальное окно. В течение первых трех лет жизни отмечались частые ОРВИ, недостаточные ростовесовые прибавки. В возрасте трех лет на фоне острого бронхита выполнена ЭхоКГ, зарегистрировано увеличение ЛП, признаки легочной гипертензии. По результатам динамического наблюдения и в связи с отрицательной динамикой размеров ЛП и внутрисердечной гемодинамики в 4 года поставлен диагноз РКМП. У ребенка с рождения отмечается камптодактилия 5-х пальцев обеих кистей и дисплазия тазобедренных суставов, данных за диффузное поражение мышечной системы или полинейропатию при проведении миографии получено не было. При биохимическом скрининге повышения  $K_{ФК_{общ}}$  отмечено не было, однако наблюдалось умеренное повышение цифр лактатдегидрогеназы (ЛДГ) до значений, в полтора раза превышающих норму. В результате молекулярно-генетического



обследования у пробанда была обнаружена T1642fs замена в гене *FLNC* (Рисунок 24б). Данный вариант не был описан ранее, однако в связи с типичным клиническим фенотипом и функциональным значением выявленной замены (потеря функциональной активности аллеля в связи со сдвигом рамки считывания), данный вариант может рассматриваться как вероятно-патогенный.

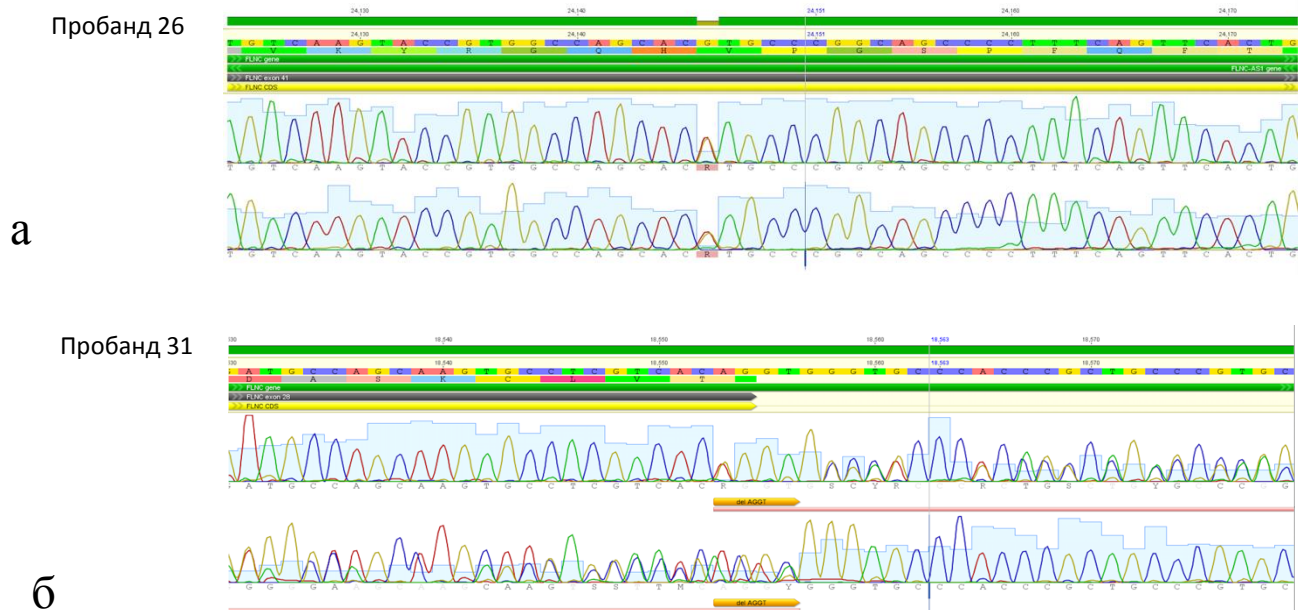


Рисунок 24 — Верификация мутаций V2297M и T1642fs в гене *FLNC*, идентифицированных методом экзомного секвенирования с помощью секвенирования по Сенгеру:

(а) — последовательность гена *FLNC* пробанда 26; (б) — последовательность гена *FLNC* пробанда 31

Для определения механизма патологического воздействия выявленных нами мутаций и уточнения их роли в формировании внутриклеточных белковых агрегатов нами было проведено моделирование эффекта описанных мутаций путем трансфекции клеток линии C2C12 с использованием липофектамина генетическими конструкциями *FLNC-GFP*, несущими замены A1183P, A1186V и P2298S. Иммуноцитохимическое окрашивание с помощью анти-GFP-антител

выявило сохранность филаментозной структуры филамина С и отсутствие внутриклеточных агрегатов (Рисунок 25).

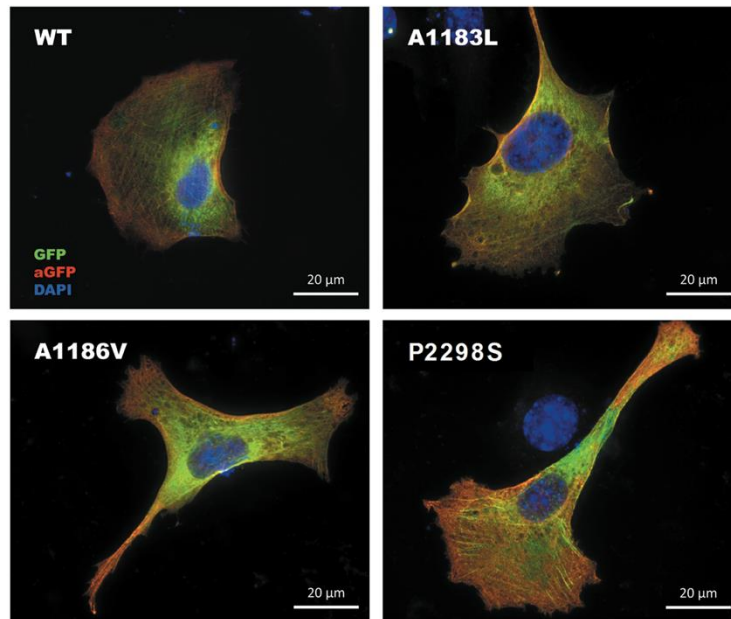


Рисунок 25 — Структурный эффект в мутации гена *FLNC*

Распределение в структуре гена *FLNC* выявленных нами, а также ранее описанных патогенных вариантов, связанных с различными типами кардиомиопатий, не позволило идентифицировать какие-либо участки гена, мутации в которых преимущественно связаны с определенным фенотипом (Рисунок 26а, б). Однако определение позиции аминокислотных замен в структуре иммуноглобулиновых доменов выявило преимущественную локализацию всех ГКМП и РКМП-ассоциированных вариантов в петлях иммуноглобулинов (Рисунок 26в). Таким образом, нами сделан вывод о том, что именно локализация аминокислотной замены в структуре иммуноглобулина, а также тип мутации (миссенс, нонсенс, сдвиг рамки считывания или мутация, приводящая к нарушению сплайсинга гена), а не расположение мутации в структуре гена, является определяющей в отношении формы кардиомиопатии и типа ремоделирования миокарда.

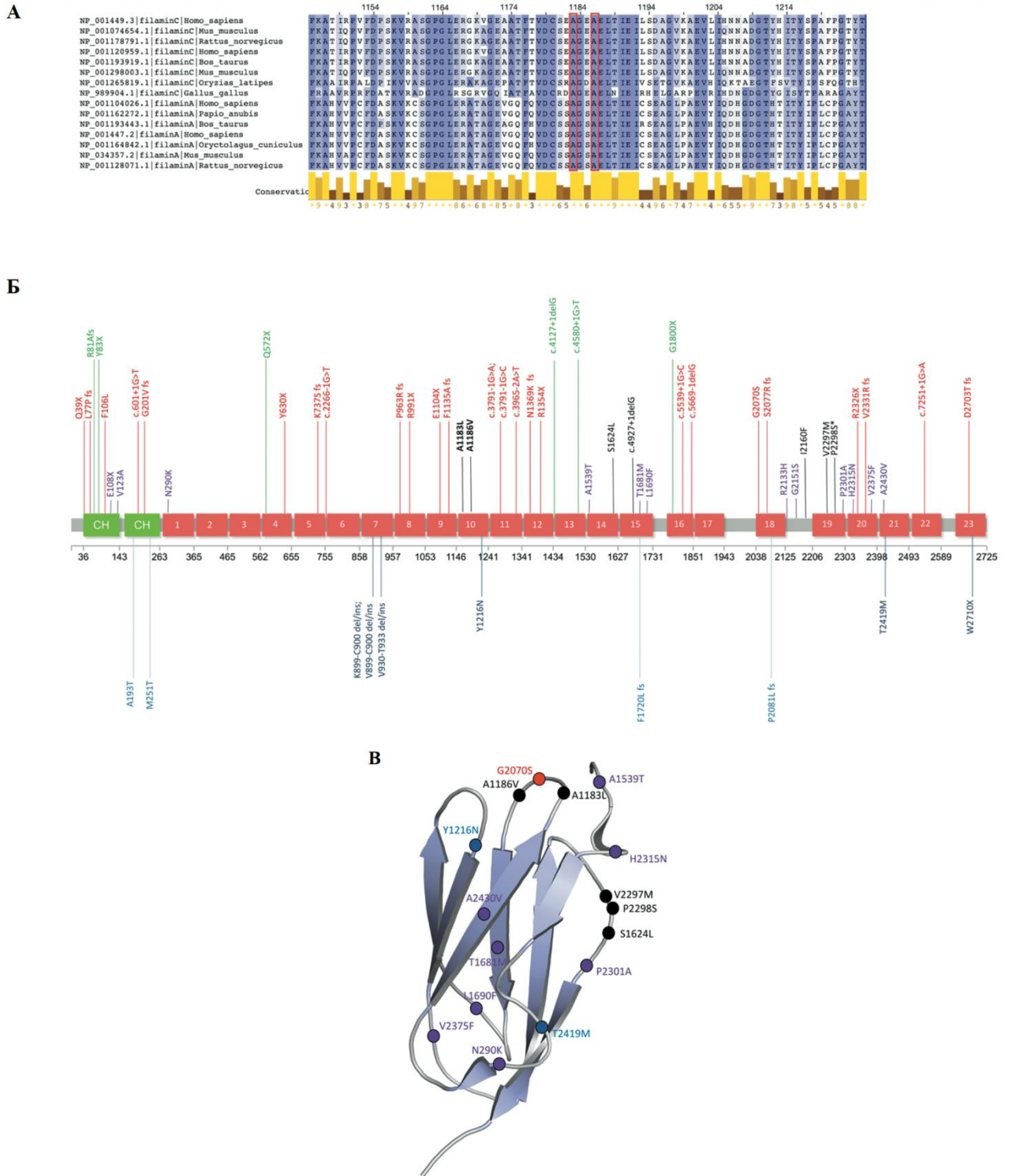


Рисунок 26 — Доменная структура филamina C:

(а) — консервативность позиций A1186V и A1183L; (б) — спектр известных мутаций филamina при ДКМП (красный), АКМП (зеленый), ГКМП (фиолетовый), миопатиях (синий) и РКМП (черный); (в) — расположение генетических вариантов, ассоциированных с РКМП в структуре иммуноглобулинового домена

## Глава 6. РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОЙ СХЕМЫ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ У ПАЦИЕНТОВ С ИДИОПАТИЧЕСКОЙ РКМП

Анализ полученных данных, иллюстрирующих широкий спектр генетических причин при идиопатической РКМП, отсутствие четкой корреляции между клинической картиной заболевания и генетической причиной РКМП в большинстве случаев, отсутствие влияния генетической природы заболевания на формирующиеся при РКМП нарушения рима и проводимости, отсутствие значимой связи между генетической причиной заболевания и возрастом дебюта заболевания, а также риском развития фатальных желудочковых нарушений ритма позволили сделать ряд выводов о целесообразности использования некоторых клинических и молекулярно-генетических диагностических методов для установления генетической природы РКМП. В частности:

— широкий спектр генов, в которых выявляются патогенные и вероятно-патогенные варианты при РКМП и отсутствие в этих генах значимых «горячих точек» делает не целесообразным применение метода секвенирования по Сенгеру для идентификации причин РКМП;

— отсутствие ассоциаций между развитием наджелудочковых (ФП) и желудочковых нарушений ритма с генетической природой заболевания делает не целесообразным определение спектра генов «первой линии диагностики», основываясь на имеющихся у пациента нарушениях ритма;

— ранее другими авторами неоднократно было продемонстрировано, что кардиомиопатии, ассоциированные с патогенными вариантами в генах *DES* и *LMNA*, в клинической картине заболевания часто имеют проявления в виде нарушения проводимости, в частности, развития SA- и AV-блокад. В нашей работе среди 8 пациентов с нарушениями проводимости (пациенты 8, 12, 17, 18, 19, 21, 32 и 35) у 4 (50%) были идентифицированы патогенные и вероятно-патогенные варианты в генах саркомерных белков, у 3 (38%) — варианты в генах белков цитоскелета, у одного пациента причинного варианта выявлено не было. Таким образом, нами не получено данных о превалировании патогенных вариантов в

генах цитоскелета и, в частности, в гене *DES* у пациентов с РКМП и нарушениями проводимости. В связи с этим представляется не целесообразным у пациентов с РКМП и нарушениями SA и AV проведения в качестве «первой линии диагностики» использовать секвенирование по Сенгеру гена *DES*, а также других генов цитоскелетных белков;

— в нашей работе среди 22 пациентов с дебютом РКМП в детском возрасте у 9 (41%) заболевание было ассоциировано с генетическими вариантами в генах цитоскелетных белков, а у 10 (45%) — с вариантами в генах саркомерных белков. В дополнение нами не было выявлено ассоциации между генетической природой заболевания и наличием признаков фенотипической трансформации РКМП либо сочетанием РКМП с признаками некомпактного миокарда и врожденными пороками сердца. Отсутствие вышеперечисленных ассоциаций между возрастом дебюта и генетической природой заболевания делает не целесообразным определения спектра генов «первой линии диагностики» в группе пациентов с РКМП с дебютом в детском возрасте;

— анализ генетической природы идиопатических случаев РКМП в сочетании с признаками НМЗ показал, что в 60% случаев этиология данной формы заболевания ассоциирована с патогенными и вероятно-патогенными вариантами в гене *FLNC*. В связи со значительной частотой выявления причинных вариантов в данном гене, в качестве «первой линии диагностики» может рассматриваться изолированное секвенирование данного гена методом Сенгера для выявления причинных мутаций. В то же время, с учетом большого размера данного гена и отсутствия в гене значимых «горячих точек», мутации в которых с высокой вероятностью ассоциированы с данной формой заболевания, массовое параллельное секвенирование с применением целевой панели, включающей ген *FLNC*, может оказаться более информативным;

— с учетом высокой частоты сочетания идиопатической РКМП с проявлениями НМЗ, а также принимая во внимание частое выявление среди генов, ассоциированных с развитием РКМП, генов, ранее описанных в качестве причины развития НМЗ (*DES*, *FLNC*, *BAG3*, *NEBL*, *FKTN*, *LDB3*, *EMD*, *SYNE2*, *MYPN*),

представляется целесообразным расширение целевой диагностической панели генов, ассоциированных с развитием КМП, за счет генов, описанных в связи с развитием НМЗ, ассоциированных с поражением миокарда;

— проведенное в нашей работе полноэкзомное секвенирование позволило расширить список генов, ассоциированных с развитием РКМП. Однако, за исключением вариантов в гене *FLNC*, большинство из выявленных впервые вариантов (в гене *SYNPO2L*, в гене *СМУА5*, в гене *TBX20*) в генах, ранее не описанных в связи с развитием КМП, являются вариантами неопределенной значимости в соответствии с классификацией ACMG. В связи с этим определение данных генетических вариантов не может широко использоваться в клинко-диагностических целях, а является поводом для проведения более углубленных фундаментальных молекулярных и клеточных исследований для выявления их функциональной значимости. В связи с чем применение метода экзомного секвенирования не может быть рекомендовано в качестве «первой линии диагностики» при идиопатических РКМП, но может рассматриваться в качестве второго этапа генетической диагностики при отсутствии выявленных патогенных и вероятно-патогенных вариантов методом массового параллельного секвенирования с применением целевых панелей.

В результате анализа спектра генетических причин идиопатической РКМП с дебютом в различных возрастных группах, а также на основе описанных фенотипически-генотипических корреляций нами предложена следующая схема проведения молекулярно-генетической диагностики данной патологии (Рисунок 27).

1. При наличии установленного диагноза идиопатической РКМП и отсутствии проявлений со стороны нейромышечной системы рекомендовано проведение генетической диагностики методом секвенирования нового поколения с использованием целевых панелей генов, ассоциированных с развитием КМП, а также ряда нейромышечных заболеваний. При отсутствии выявленных данным способом патогенных и/или вероятно-патогенных вариантов, а также вариантов в генах, ранее описанных в связи с развитием КМП, но являющихся в соответствии

с классификацией ACMG вариантами неопределенной значимости, в качестве следующего шага диагностического поиска может рассматриваться проведение полноэкзомного секвенирования.

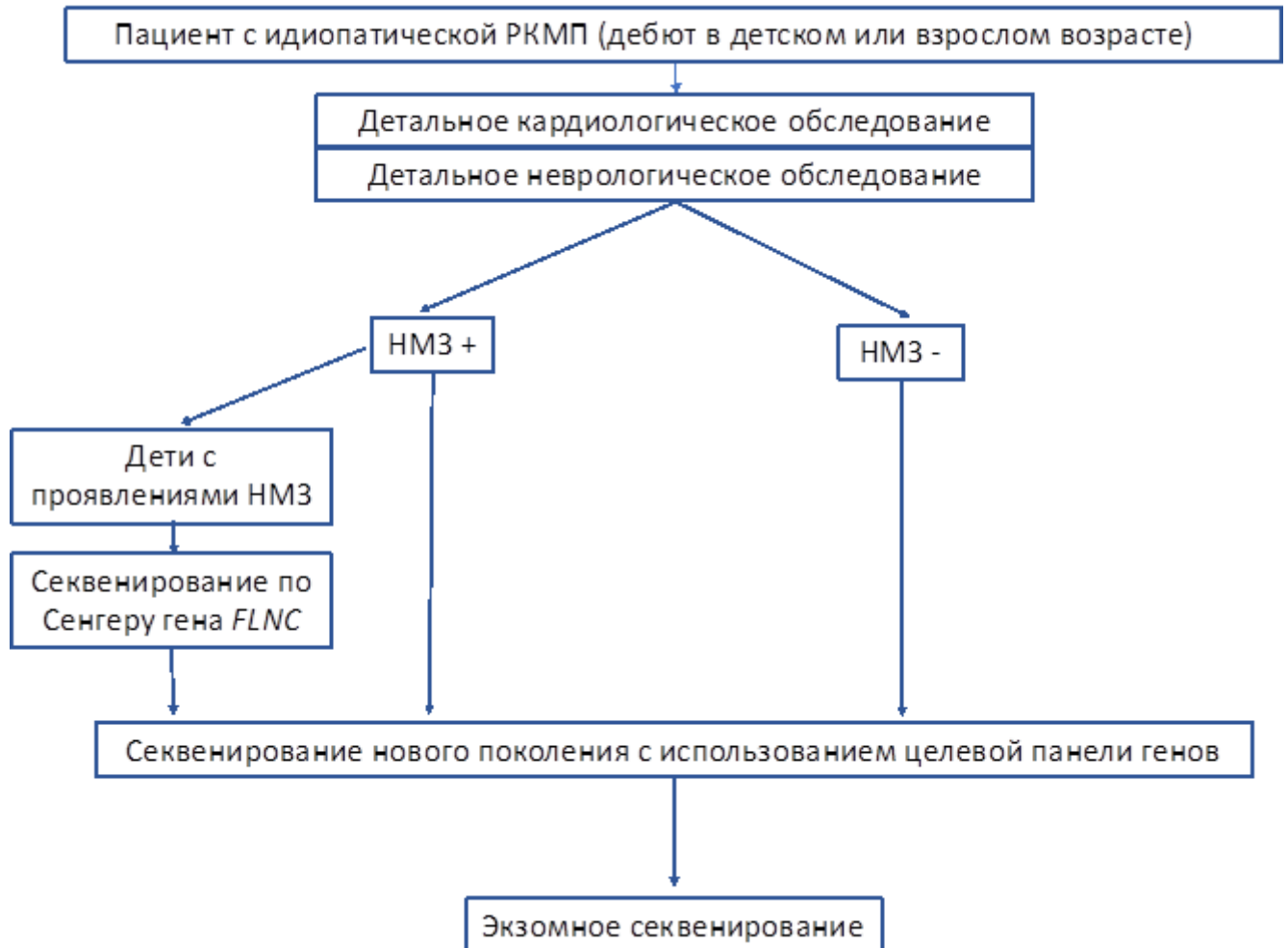


Рисунок 27 — Схема генетической диагностики при выявлении идиопатической РКМП

2. При наличии установленного диагноза идиопатической РКМП и проявлений со стороны нейромышечной системы в качестве «первой линии диагностики» может рассматриваться применение метода секвенирования по Сенгеру гена *FLNC*, особенно в случае дебюта заболевания в детском возрасте. Наиболее информативным в данном случае является проведение генетической диагностики методом секвенирования нового поколения с использованием целевых панелей генов, ассоциированных с развитием КМП и ряда нейромышечных заболеваний.

При отсутствии выявленных данным способом патогенных и/или вероятно-патогенных вариантов, а также вариантов в генах, ранее описанных в связи с развитием КМП, но являющихся в соответствии с классификацией ACMG вариантами неопределенной значимости, в качестве следующего шага диагностического поиска может рассматриваться проведение полноэкзомного секвенирования.

3. При наличии установленного диагноза идиопатической РКМП в сочетании с нарушениями проводимости в виде развития SA- и AV-блокад, представляется малоинформативным в качестве «первой линии диагностики» использование метода секвенирования по Сенгеру с определением последовательностей генов *DES* и *LMNA*.

4. При поиске возможных патогенных и вероятно-патогенных вариантов в генах, ассоциированных с развитием РКМП, алгоритм биоинформатического анализа, включающий определение популяционной частоты выявленного аллеля, его предиктивной функциональной значимости и степени экспрессии гена в миокарде, целесообразно расширить с целью определения аллельного состояния выявленного варианта. Данный алгоритм позволит выявлять варианты с популяционной частотой выше ожидаемой при РКМП, однако потенциально приводящие к развитию заболевания вследствие их гомозиготного состояния.



## Глава 7. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУТАЦИЯМИ ГЕНА ДЕСМИНА *DES*

### 7.1. Оценка влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального $Ca^{2+}$ в первичной культуре мышечных клеток

Для оценки влияния мутантных форм гена десмина на изменение концентрации митохондриального кальция использовалась первичная культура мышечных клеток (сателлитные клетки), генетически модифицированных лентивирусными конструкциями, несущими ген десмина дикого типа или мутантные формы десмина. Первичную культуру сателлитных клеток получали из *m. soleus* мышей линии C57bl (Рисунок 28а, б). Поскольку *m. soleus* относится к типу медленных мышц, то процессы окислительного фосфорилирования и митохондриального дыхания играют в процессе ее функционирования ключевую роль. Вирусную трансдукцию для генетической модификации проводили в момент выделения сателлитных клеток. Трансдуцированные сателлитные клетки подвергали миогенной дифференцировке с формированием миотрубок (Рисунок 28в, г). Для оценки осцилляции митохондриального кальция использовали краситель Rhod 2-AM (Invitrogen, США), имеющий высокую аффинность к митохондриальному кальцию. С целью повышения уровня митохондриального кальция проводили стимуляцию мышечных клеток электрическим током с частотой 1, 10 и 100 Гц, а также хлорамкрезолом (СmС). Предварительные эксперименты с выделенной культурой клеток показали, что первичные мышечные сателлитные клетки поддаются лентивирусной трансдукции с высокой эффективностью, что обеспечивает постоянную экспрессию гена интереса. Сформированные из этих клеток миотрубки отвечают на химические и электрические стимуляции увеличением цитоплазматического кальция, что

является подтверждением зрелости их мембранной системы проведения сигнала и депонирования внутриклеточного кальция.

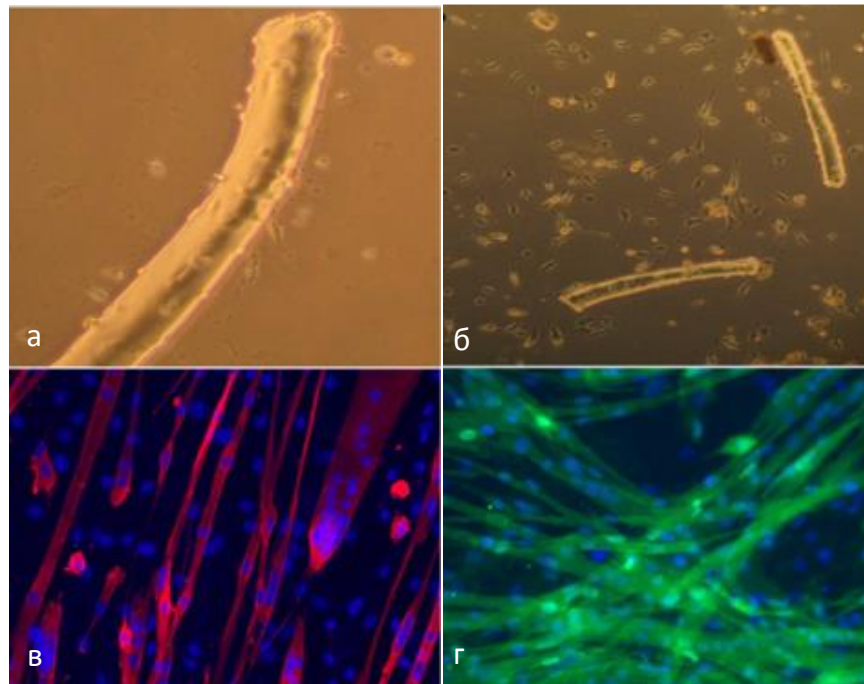


Рисунок 28 — Первичные миотрубки, сформированные путем дифференцировки сателлитных клеток:

(а) — первичные миофибриллы, используемые для получения сателлитных клеток и миотрубок,  $\times 40$ ; (б) — сателлитные клетки, полученные путем «выползания» из-под базальной мембраны первичных миофибрилл,  $\times 20$ ; (в, г) — первичные миотрубки, сформированные сателлитными клетками. Красный — окрашивание антителами к десмину, синий — ядра, зеленый — окрашивание антителами к тяжелым цепям миозина,  $\times 40$

## 7.2. Эффект мутаций гена десмина на внутримитохондриальный захват кальция под воздействием электрического тока

С целью повышения уровня митохондриального кальция проводили стимуляцию мышечных клеток электрическим током с частотой 1, 10 и 100 Гц. Разницы в увеличении интенсивности сигнала между стимуляциями током с

частотой 10 и 100 Гц зафиксировано не было, в то время как стимуляция током с частотой 1 Гц вызывала достоверно меньшее увеличение интенсивности флюоресцентного сигнала (Рисунок 29а). В связи с этим все последующие эксперименты проводились с использованием электрической стимуляции током с частотой 10 Гц. Изменение уровня внутримитохондриального кальция определяли из соотношения постстимулированного уровня к базовому ( $F/F_0$ ). При сравнении эффекта десмина дикого типа с мутантными формами DesL345P, DesA357P, DesL370P и DesD399Y наблюдалось достоверное снижение содержания внутримитохондриального кальция  $[Ca^{2+}]_{mit}$  под воздействием мутаций L345P и A357P, определяемое по соотношению показателей  $F/F_0$ , на 50% и 44% соответственно (Рисунок 29б). В то же время мутации L370P и D399Y не вызывали достоверного изменения уровня внутримитохондриального кальция  $[Ca^{2+}]_{mit}$  ( $3,45 \pm 0,53$  и  $2,85 \pm 0,31$ ).

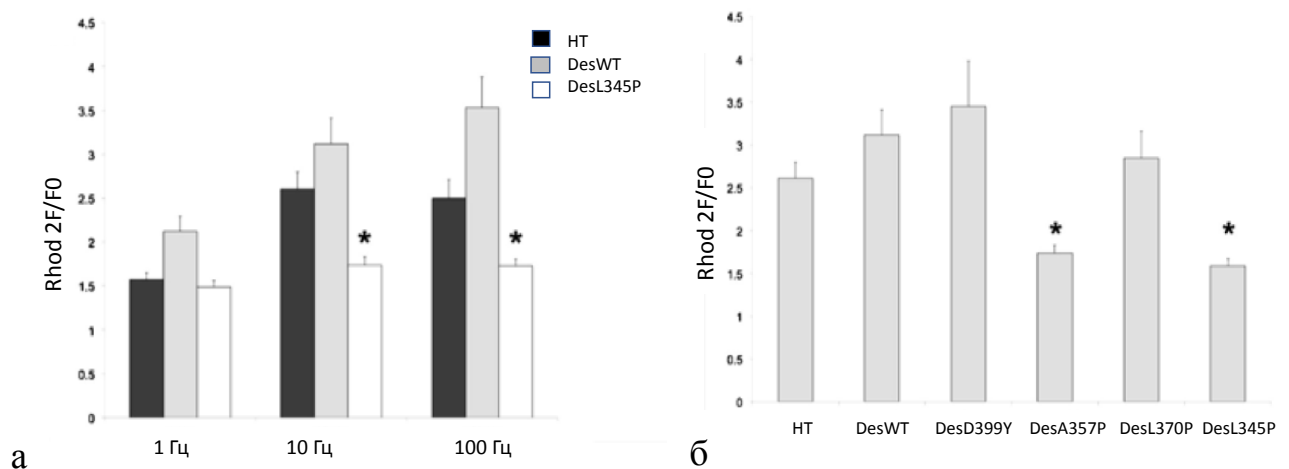


Рисунок 29 — Эффект электрической стимуляции на внутримитохондриальный уровень кальция в мышечных клетках:

(а) — значения отношения  $F/F_0$ , достигнутые при стимуляции током с частотой 1, 10 и 100 Гц; (б) — максимальные значения отношения  $F/F_0$ , достигнутые при стимуляции током частотой 10 Гц для клеток, несущих десмин дикого типа (DesWT) и мутантные формы десмина (DesD399Y, DesA357P, DesL370P и DesL345P)

### 7.3. Влияние мутаций гена десмина на внутримитохондриальный захват кальция вследствие активации рианодинового рецептора

Альтернативным электрической стимуляции методом повышения цитоплазматического уровня кальция и его митохондриального захвата в миотрубках является применение 4-хлор-М-крезола (CmC), который является агонистом рианодинового рецептора. В нашем эксперименте применение CmC в концентрации 2 мМ приводило к повышению внутримитохондриального уровня кальция в миотрубках (Рисунок 30а). Данный ответ наблюдался через несколько секунд после начала перфузии и достигал максимального значения через 20 сек.

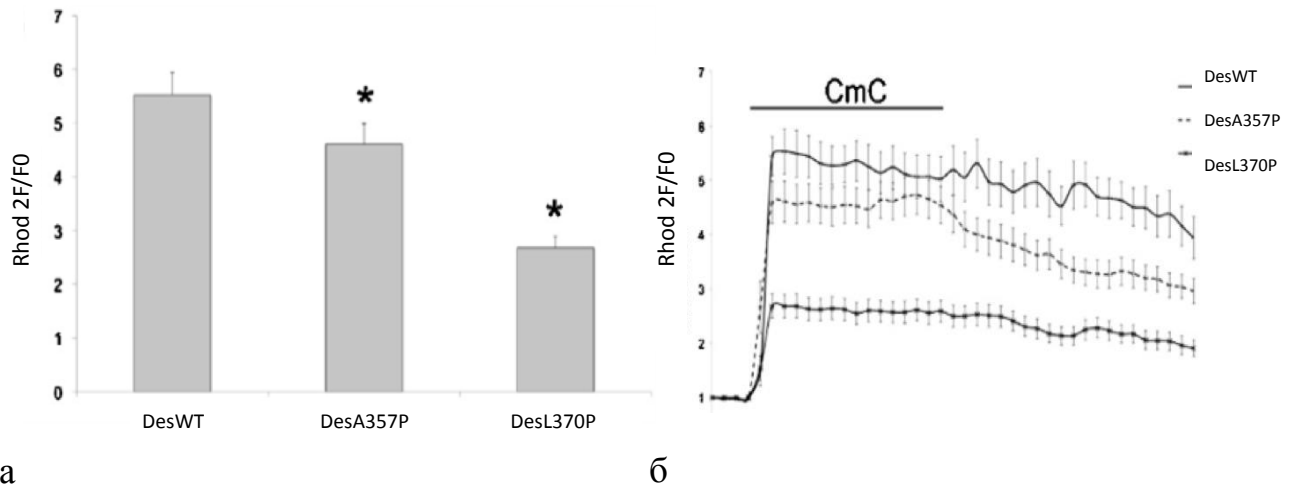


Рисунок 30 — Эффект стимуляции рианодинового рецептора хлор-М-крезолом на внутримитохондриальный уровень кальция в мышечных клетках:

(а) — значения отношения  $F/F_0$ , достигнутые при применении 4-хлор-М-крезола в культурах, трансдуцированных десмином дикого типа (DesWT) и мутантными формами десмина (DesD399Y, DesA357P, DesL370P и DesL345P);

(б) — динамика внутримитохондриальной концентрации кальция после применения 4-хлор-М-крезола в культурах, трансдуцированных десмином дикого типа (DesWT) и мутантными формами десмина (DesD399Y, DesA357P, DesL370P и DesL345P)

Прекращение перфузии  $Ca^{2+}$  приводило к постепенному и медленному снижению концентрации внутримитохондриального кальция. В данном эксперименте мы изучали влияние мутаций A357P и L370P гена десмина на уровень внутримитохондриального кальция. При химической стимуляции риадинового рецептора наблюдалось значительно меньшее возрастание внутримитохондриального уровня кальция в клетках, несущих мутантный вариант DesL370P и особенно DesA357P гена десмина, по сравнению с клетками, несущими ген десмина дикого типа (Рисунок 30б).

#### **7.4. Эффект мутаций гена десмина на уровень цитоплазматического кальция**

Повышение внутримитохондриального уровня кальция является следствием возрастания его концентрации в цитоплазме. Сниженное поступление ионов кальция в митохондриальный матрикс приводит к накоплению их в цитозоле и возрастанию цитозольной концентрации ионов кальция  $[Ca^{2+}]_i$ . Для изучения цитоплазматической динамики кальциевых токов под воздействием различных мутаций гена десмина мы исследовали цитоплазматическую концентрацию кальция после электрической стимуляции. На начальном этапе мы сравнили кривые внутрицитоплазматической и внутримитохондриальной концентрации кальция с помощью красителей Rhod2 и Fluo3. Как видно на Рисунке 31а, возрастание внутримитохондриальной концентрации ионов кальция является прямым следствием повышения его цитоплазматической концентрации  $[Ca^{2+}]_i$  и наступает с небольшой задержкой после возрастания уровня кальция в цитозоле.

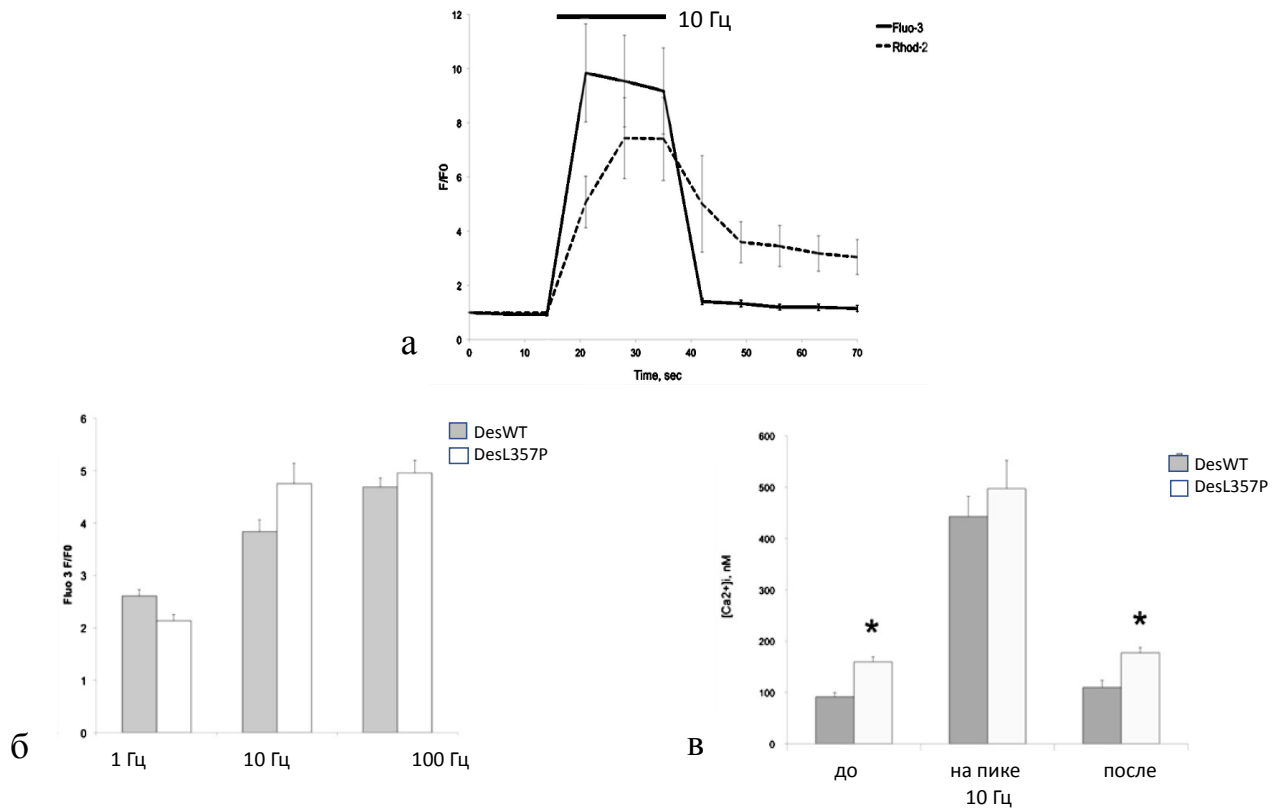


Рисунок 31 — Динамика уровня цитоплазматического кальция под влиянием электрической стимуляции:

(а, б) — максимальные значения цитоплазматического отношения  $F/F_0$ , достигнутые при стимуляции током разной частоты для клеток, несущих десмин дикого типа и мутантные формы десмина ( $DesA357P$ ) при использовании красителей Rhod2 и Fluo3; (в) — величина цитоплазматического уровня кальция при использовании красителя Indo 1

Степень увеличения цитозольного кальция не отличалась существенно после трансдукции миоцитов геном десмина дикого типа и мутантной формой десмина ( $DesA357P$ ) ни при одной из исследуемых частот электрической стимуляции (Рисунок 31б).

При использовании нерациометрических флюоресцентных красителей Rhod 2 и Fluo 3 возможно определение только относительного количества ионов кальция в зависимости от уровня флюоресценции. Для получения абсолютного уровня цитозольного кальция мы использовали внутриклеточный краситель Indo 1.

При стимуляции током с частотой 10 Гц не наблюдалось разницы в пиковом возрастании цитоплазматического кальция в миотрубках, трансдуцированных DesA357P формой десмина и десмином дикого типа ( $497 \pm 55$  нМ и  $443 \pm 10$  нМ соответственно, Рисунок 31в). Однако как базовый, так и постстимуляционный уровень цитоплазматического кальция  $[Ca^{2+}]_i$  был достоверно выше при трансдукции клеток мутантной формой десмина по сравнению с десмином дикого типа ( $160 \pm 10$  нМ и  $91 \pm 9$  нМ соответственно, Рисунок 31в).

Таким образом, введение мутантной формы десмина в миотрубки не приводило к значимому изменению пикового уровня цитоплазматического кальция при электрической стимуляции, но вызывало повышение цитоплазматического кальция в покое до и после стимуляции.

В результате проведенных исследований нами было показано, что миотрубки, сформированные из первичных сателлитных клеток, отвечают на те типы воздействия, которые затрагивают систему рианодиновых рецепторов, напрямую или опосредованно через дигидропиридиновые рецепторы. При сравнении уровня внутримитохондриального кальция после стимуляции током с частотой 10 Гц было показано, что в мутантных клетках уровень захвата кальция меньше по сравнению с клетками, несущими десмин дикого типа. При химическом воздействии CmC интенсивность сигнала в этих клетках также ниже, чем в клетках с десмином дикого типа.

### **7.5. Оценка методом «Sea horse» функции клеточного дыхания в культуре миотрубок после трансдукции нормальными и мутантными формами гена десмина**

В основе метода измерения митохондриального дыхания в культуре клеток с помощью аппарата «Sea horse» лежит регистрация концентрации ионов кислорода непосредственно на поверхности клеток под воздействием ингибиторов процесса окислительного фосфорилирования, благодаря чему методика позволяет измерять потребление энергии и митохондриальное дыхание в живых клетках.

Типичный график, полученный после эксперимента, представлен на Рисунке 32. Эксперимент включал 12 временных точек, по три временные точки для каждого из 4 этапов измерения. После измерения базального уровня потребления кислорода, т. н. базового дыхания, в систему добавлялся олигомицин — ингибитор АТФ-азы, снижающий уровень потребления кислорода и угнетающий процесс окислительного фосфорилирования. После регистрации трех точек в фазу ингибированного дыхания система стимулировалась добавлением карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP). После регистрации трех точек в фазу ингибированного дыхания система стимулировалась добавлением карбонилцианид-п-трифторметоксифенилгидразона (FCCP).

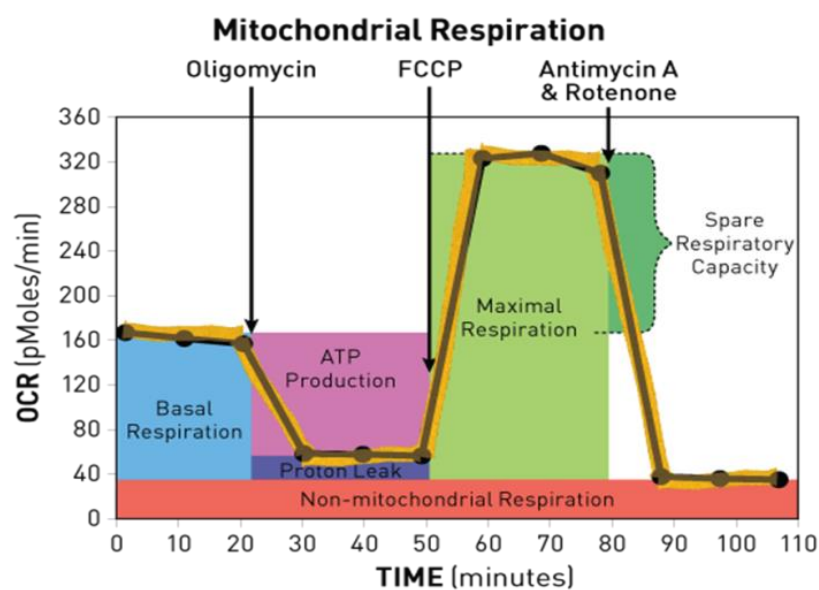


Рисунок 32 — Типичный график регистрации концентрации кислорода в культуре мышечных клеток, полученный с помощью прибора «Sea horse»

Этот ионофор разобщает процессы окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ, усиливает транспорт протонов через мембрану, снижает протонный градиент и стимулирует процесс окислительного фосфорилирования и потребления кислорода. На следующем этапе добавление в систему ингибитора дыхательной цепи антимицина приводит к падению потребления кислорода.

Для измерения уровня продукции кислорода мышечными клетками под влиянием различных мутаций гена десмина сателлитные клетки трансдуцировали лентивирусными конструкциями, несущими нормальный и мутантные формы десмина, и культивировали на 96-луночной планшете. После достижения клетками



конфлюентности в них была индуцирована дифференцировка, которую проводили в течение семи дней. Каждый клеточный тип (незараженные клетки, клетки, несущие десмин дикого типа или мутантную форму десмина) был продублирован по меньшей мере в 14 лунках. Измерение уровня кислорода с помощью прибора «Sea horse» показало, что все клеточные линии (нетрансдуцированные клетки, клетки, трансдуцированные десмином дикого типа и мутантными формами десмина) имели схожие графики митохондриального дыхания и отвечали на применение ингибиторов и стимуляторов клеточного дыхания ожидаемым образом. Для культуры клеток, трансдуцированных десмином дикого типа, наблюдался чуть более высокий уровень стимулированного дыхания по сравнению с нетрансдуцированными культурами (Рисунок 33а, б). Данное отличие, однако, не являлось статистически достоверным. Трансдукция мутантными формами десмина DesL345P, DesA357P и DesD399Y приводила к значимому снижению уровня максимального стимулированного дыхания под воздействием FCCP, но не влияла на уровень немитохондриального потребления кислорода (Рисунок 33в, г). Таким образом, под воздействием мутантных форм десмина DesL345P, DesA357P и DesD399Y в дифференцированных клетках мышечной линии наблюдалось достоверное снижение уровня стимулированного митохондриального дыхания.

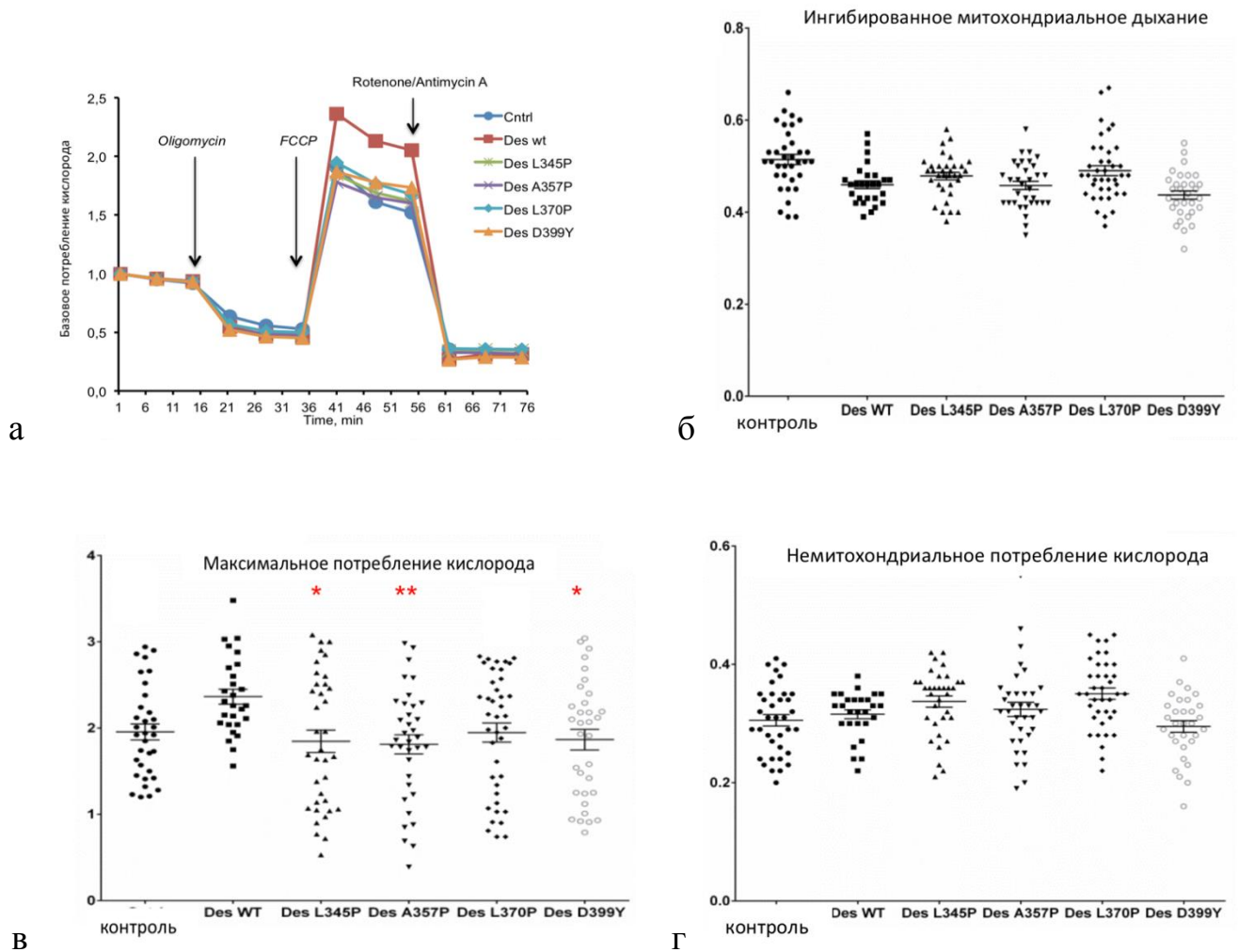


Рисунок 33 — Графики регистрации уровня кислорода на поверхности культуры мышечных клеток с помощью прибора «Sea horse»:

(а) — для всех культур регистрировались схожие графики митохондриального дыхания и реакция на применение ингибиторов и стимуляторов; (б) — уровень ингибированного митохондриального дыхания; (в) — уровень стимулированного FCCP дыхания; (г) — базовый уровень немитохондриального дыхания в клетках, несущих различные формы десмина

## 7.6. Оценка функции потенциалзависимых натриевых каналов (Nav1.5) в кардиомиоцитах, несущих с.735+1G>A мутацию в гене *DES*

Влияние мутаций в гене десмина на функцию потенциалзависимого натриевого канала оценивалось в кардиомиоцитах, полученных путем

направленной дифференцировки в кардиогенном направлении иПСК, полученных от пациента с с.735+1G>A мутацией в гене *DES*. Оценка функции потенциалзависимого натриевого канала проводилась методом локальной фиксации мембранного потенциала. Как показано на Рисунке 34, нами не было зарегистрировано достоверных различий в плотности тока и кривой стационарной активации между иПСК-кардиомиоцитами здорового донора и пациента с с.735+1G>A мутацией в гене *DES*. Полученные данные говорят об отсутствии влияния с.735+1G>A мутации на плотность входящего натриевого тока в кардиомиоцитах, однако не исключают нарушения других функциональных характеристик Nav1.5 под воздействием данной или других агрегатных или неагрегатных мутаций в гене *DES*.

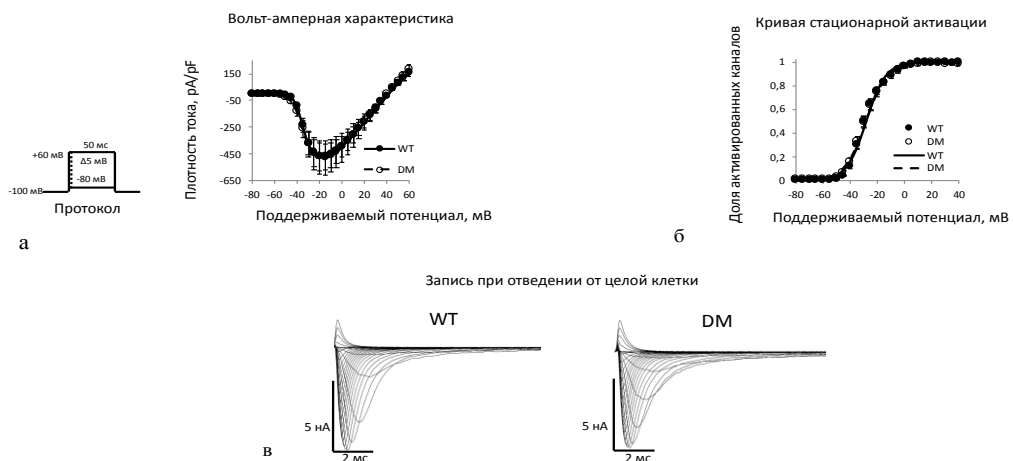


Рисунок 34 — Графики регистрации натриевого тока в кардиомиоцитах, полученные путем направленной кардиогенной дифференцировки иПСК пациента, несущего с.735+1G>A мутацию в гене десмина: (а) — вольт-амперная характеристика натриевого тока; (б) — кривая стационарной активации; (в) — натриевый ток, зарегистрированный при отведении от целой клетки. WT — клетки дикого типа, DM — клетки с мутацией в гене десмина

## Глава 8. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУТАЦИЯМИ ГЕНА *LMNA*

### 8.1. Характеристика мезенхимных стволовых клеток и уровень экспрессии *LMNA* после лентивирусной трансдукции

Мутации в гене ламина (*LMNA*) являются одной из частых причин развития кардиомиопатий. Недавно патогенные варианты в данном гене были описаны в связи с развитием рестриктивного фенотипа при РКМП [139, 306]. В то же время мутации в данном гене приводят к развитию целого спектра различных заболеваний, включая патологии костной системы, жировой ткани, эндокринных органов и периферических мышц. Поскольку в подавляющем большинстве случаев ткани и органы, в которых развивается патологический процесс при ламинопатиях, имеют мезенхимное происхождение, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки-предшественники (ММСК) могут являться информативной моделью для изучения патогенеза ламинопатий.

Мезенхимные стволовые клетки жировой ткани человека культивировали в стандартных условиях, описанных в главе «Материалы и методы» (раздел 2.18). На третьем пассаже ММСК имели типичный иммунофенотип, экспрессировали маркеры CD105/CD90/CD166/CD73 и были отрицательными по маркерам CD34/CD19/CD45. Культивирование в условиях адипогенной дифференцировки приводило к окрашиванию клеток масляным красным и появлению в них липидных капель, а в условиях остеогенной дифференцировки — к окрашиванию ализариновым красным.

Оценку эффекта мутаций в гене *LMNA* на свойства и функции ММСК проводили после генетической модификации клеток (лентивирусной трансдукции) плазмидами, несущими мутантные формы *LMNA* (LMNAR471L, LMNAR482L, LMNAG465D, LMNAG232E и LMNAR527). На начальном этапе при помощи ПЦР в реальном времени оценивался уровень экспрессии ламина А/С после

модификации ММСК лентивирусной конструкцией, несущей ген ламина дикого типа LMNAWT либо мутантные формы ламина A/C. Трансдукция указанными генетическими конструкциями не приводила к существенному изменению экспрессии, усилению либо ингибированию ламина (Рисунок 35а, б).

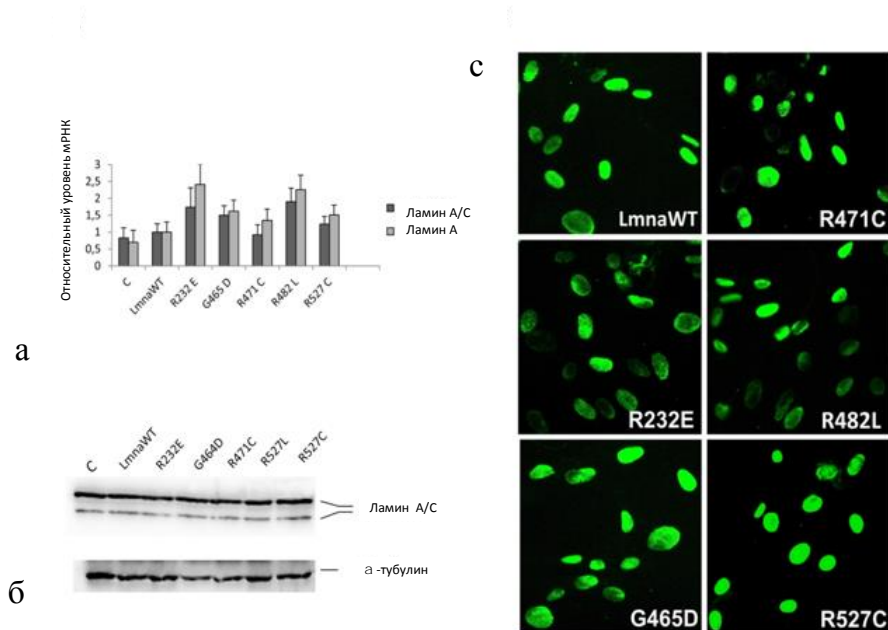


Рисунок 35 — Экспрессия ламина A/C после модификации ММСК лентивирусными конструкциями, несущими ген ламина дикого типа LMNAWT либо мутантные формы ламина A/C:

(а) — экспрессия гена ламина, определяемая на уровне мРНК с помощью ПЦР в реальном времени; (б) — уровень белка ламина A/C после модификации ММСК, определяемый методом Вестерн-блоттинга; (в) — окрашивание трансдуцированных культур ММСК антителами к ламину A/C

Иммуноокрашивание трансдуцированных клеток антителами против ламина не выявило существенных структурных нарушений во внутриклеточном распределении ламина, а также нарушений формы и размера ядер трансдуцированных клеток (Рисунок 35с). Таким образом, введение лентивирусных генетических конструкций с ламином дикого типа и мутантными

его формами не приводило к существенным нарушениям его экспрессии, внутриядерного распределения и морфологии ядра.

## 8.2. Влияние мутации гена ламина на колониобразующую способность ММСК

Способность к колониобразованию является одной из ключевых характеристик ММСК, поэтому мы оценивали методом предельных разведений влияние различных мутаций гена *LMNA* на способность ММСК к клональной экспансии. Во всех клеточных линиях, трансдуцированных мутантными формами ламина А/С, отмечалось достоверное снижение способности к образованию колоний по сравнению с клетками, трансдуцированными ламином дикого типа Рисунок 36.

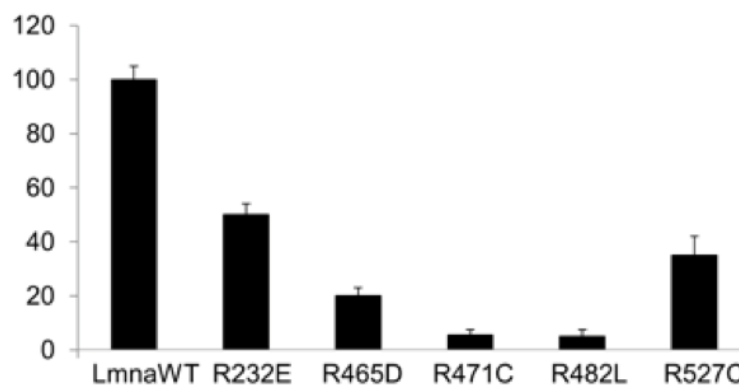


Рисунок 36 — Колониобразующая способность ММСК после трансдукции различными мутантными формами ламина и ламином дикого типа.

Ось Y — относительное количество колоний. Ось X — эффект различных мутаций гена *LMNA*

Наиболее выраженное ингибирующее действие наблюдалось при трансдукции клеток мутантными формами LMNAR471L и LMNAR482L, в то время как для LMNAG465D отмечался менее выраженный эффект. Мутации LMNAG232E и LMNAR527C оказывали наименьшее влияние на

колониеобразующую способность ММСК. Таким образом, мутации гена *LMNA* значительно уменьшают клоногенные свойства ММСК.

### **8.3. Влияние мутаций гена ламина на адипогенную и остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток**

Влияние различных мутаций *LMNA* на адипогенную дифференцировку ММСК оценивалось посредством окрашивания клеток в терминальной стадии адипогенной дифференцировки масляным красным (Рисунок 37а, б). Мутации, связанные с развитием частичной семейной липодистрофии (ЧСЛД) (*LMNAG465D* и *LMNAR482L*) и мандибулоакральной дисплазии (МАД) (*LMNAR527C*), приводили к достоверному увеличению способности трансдуцированных ими ММСК к адипогенной дифференцировке по сравнению с ламинем дикого типа (*LMNAWT*). Данная тенденция отмечалась также и для мутаций *LMNAG232E* и *LMNAR471C*, однако не достигала уровня значимости. Таким образом, ЧСЛД-ассоциированные мутации гена ламина значительно повышают способность ММСК к адипогенной дифференцировке.

Следующим этапом исследований было изучение влияния мутаций *LMNA* на остеогенную дифференцировку. ММСК в терминальной стадии остеогенной дифференцировки окрашивали ализариновым красным (Рисунок 37в, г). Мутация, ассоциированная с развитием МАД (*LMNAR471C*), приводила к статистически значимому увеличению способности трансдуцированных ММСК к остеогенной дифференцировке по сравнению с ламинем дикого типа. Данная тенденция наблюдалась после введения в ММСК других мутаций гена ламина, однако при введении мутаций *LMNAG232E* и *LMNAR482* это увеличение не достигало уровня значимости. Таким образом, МАД-связанные мутации гена *LMNA* стимулируют остеогенную дифференцировку ММСК.

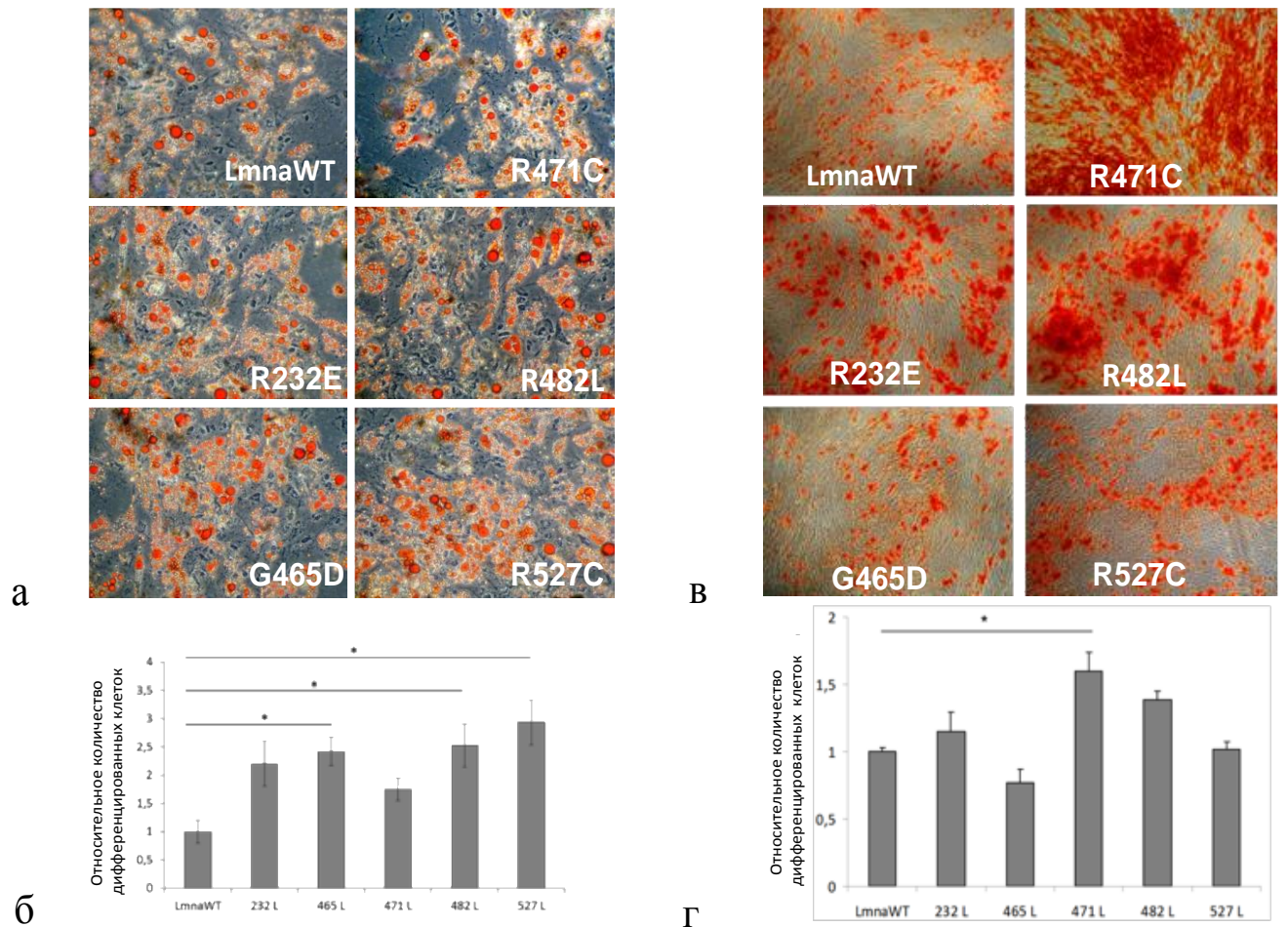


Рисунок 37 — Влияние различных мутаций гена ламина на дифференцировку ММСК в адипогенном и остеогенном направлении:

(а) — окрашивание результатов адипогенной дифференцировки масляным красным; (б) — подсчет результатов адипогенной дифференцировки; (в) — окрашивание результатов остеогенной дифференцировки ализариновым красным; (г) — подсчет результатов остеогенной дифференцировки

#### 8.4. Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров адипогенной дифференцировки ММСК

Поскольку процесс дифференцировки включает в себя одновременную активацию транскрипции ряда тканеспецифических факторов, мы исследовали



эффект мутаций *LMNA* на экспрессию факторов адипогенеза *PPARG*, *SREBP1* и *CFD* (адипсин) на различных этапах от начала адипогенной дифференцировки ММСК: на 3, 7 и 14 день. При трансдукции клеток LMNAWT естественная динамика экспрессии *PPARG*, *SREBP1* и *CFD* значительно не менялась (Рисунок 38а). Трансдукция мутантными вариантами гена *LMNA* оказывала существенный эффект на профиль экспрессии тканеспецифичных генов, при этом для каждого типа мутации был характерен свой собственный профиль изменения экспрессии (Рисунок 38б).

Важно отметить, что прямой корреляции между изменением профиля экспрессии тканеспецифичных генов и итоговым влиянием мутаций *LMNA* на дифференцировку ММСК отмечено не было. Так, только мутации G465D и G232E вызывали одновременное повышение экспрессии *PPARG*, *SREBP1*, *CFD* и приводили к усиленной адипогенной дифференцировке ММСК. Для остальных мутаций, в частности R482L и R527C, значимого изменения экспрессии тканеспецифичных генов не наблюдалось, либо оно отмечалось в небольшой степени, несмотря на значительный эффект в отношении адипогенной дифференцировки ММСК. Противоположный эффект был отмечен для мутации R471C, которая приводила к значимому повышению уровня экспрессии *PPARG*, *SREBP1*, *CFD*, несмотря на отсутствие значимого воздействия на эффективность адипогенной дифференцировки ММСК. Таким образом, не наблюдалось прямой корреляции между эффектом мутаций *LMNA* в отношении способности к адипогенной дифференцировке ММСК и экспрессией маркеров адипогенной дифференцировки.

### **8.5. Влияние мутаций гена ламина на экспрессию маркеров остеогенной дифференцировки ММСК**

На следующем этапе мы исследовали эффект мутаций *LMNA* на экспрессию факторов остеогенной дифференцировки. Эффект мутаций *LMNA* в отношении

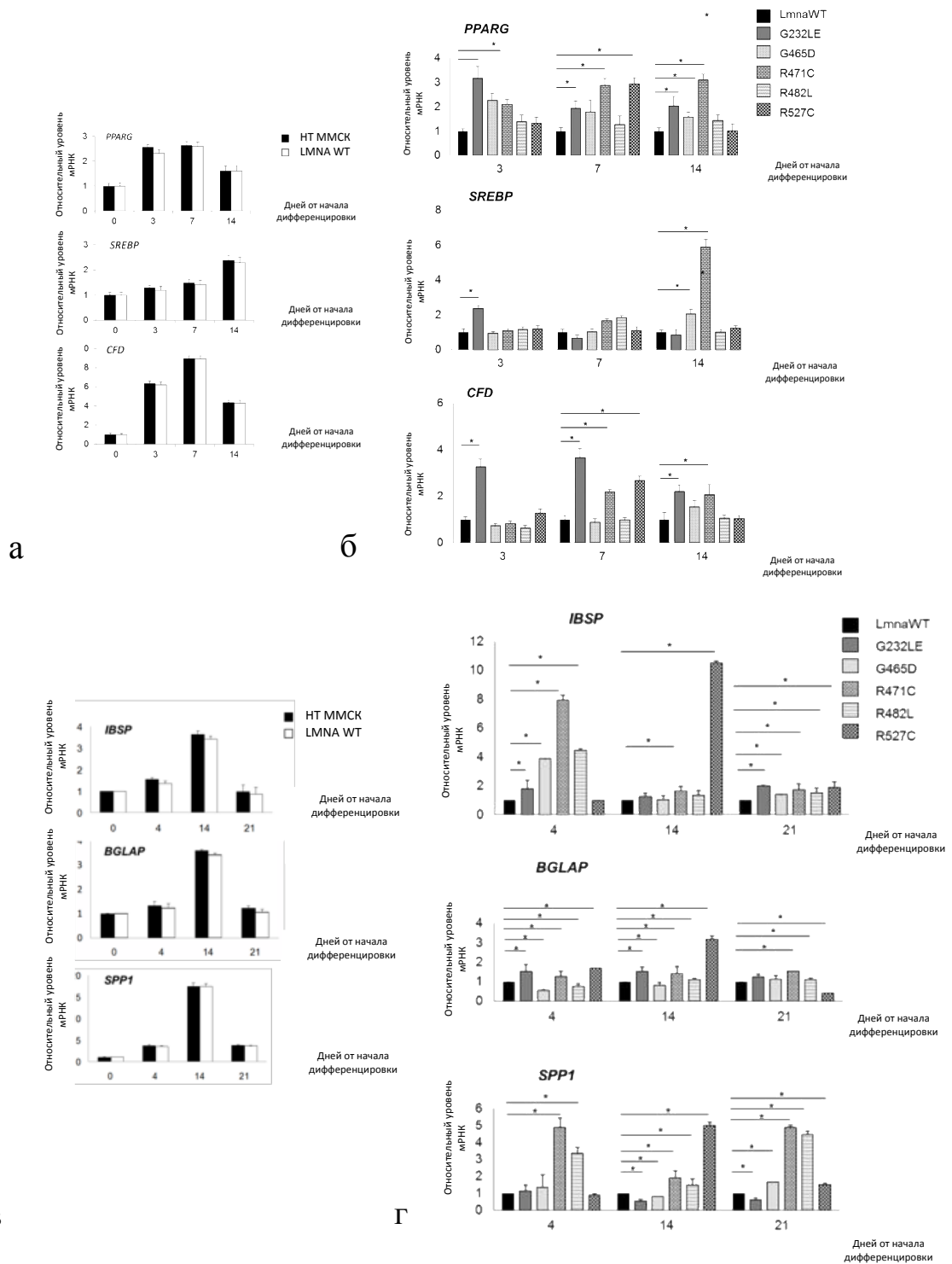


Рисунок 38 — Эффект мутаций *LMNA* на экспрессию маркеров дифференцировки ММСК. Сравнение уровня маркеров адипогенной (а) и остеогенной (в) дифференцировки в нетрансдуцированных клетках и клетках, трансдуцированных ламином дикого типа. Сравнение уровня экспрессии маркеров адипогенной (б) и остеогенной (г) дифференцировки после трансдукции различными мутантными формами *LMNA*.

экспрессии основных остеогенных маркеров *IBSP1*, *GGLAP* и *SPP1* оценивался, как и в случае адипогенной дифференцировки, на нескольких временных точках (4, 14 и 21 дни). Трансдукция конструкцией с ламином дикого типа LMNAWT не приводила к изменению в уровне экспрессии *IBSP*, *GGLAP* и *SPP1* (Рисунок 38в). Сходно с эффектом, наблюдаемым при адипогенной дифференцировке, прямой корреляции между способностью ММСК к остеогенной дифференцировке и уровнем экспрессии основных маркеров остеогенной дифференцировки не отмечалось (Рисунок 38г). Одновременное увеличение экспрессии *IBSP1* и *SPP1* в сочетании с усилением способности ММСК к остеогенной дифференцировке по результатам окрашивания ализариновым красным отмечалось только в случае мутации R471C. В отличие от наблюдаемого для мутации R471C эффекта, мутация R527C вызывала достоверное увеличение уровня экспрессии всех трех маркеров остеогенной дифференцировки, но не приводила к изменению результирующего остеогенного потенциала ММСК. Таким образом, мы не выявили прямую взаимосвязь между влиянием мутаций *LMNA* на способность к остеогенной дифференцировке ММСК и экспрессией основных маркеров остеогенеза.

#### **8.6. Влияние мутации *LMNA* на экспрессионный профиль при дифференцировке ММСК**

Увеличенная способность ММСК к дифференцировке в адипогенном и остеогенном направлениях под воздействием мутаций гена *LMNA* не всегда коррелирует с изменением экспрессии основных маркеров дифференцировки. В связи с этим мы проанализировали влияние мутаций *LMNA* на экспрессию 84 генов, участвующих в тканеспецифичной дифференцировке, при помощи ПЦР в реальном времени на разных временных точках дифференцировки. Список проанализированных генов адипогенной дифференцировки представлен в Таблице 23.

Таблица 23 — Список генов, участвующих в адипогенной дифференцировке и проанализированных в ММСК под воздействием мутаций гена *LMNA*

Гены, участвующие в процессе адипогенной дифференцировки ММСК		
Регуляторные гены	Адипокины	<i>ADIG, ADIPOQ, CFD, LEP, RETN</i>
	Гормоны	<i>AGT, ANGPT2</i>
	Ферменты	<i>LIPE, LP</i>
Мишени фактора PPAR	—	<i>ADIPOQ, AGT, CEBPA, CFD, FABP4, FASN, IRS2, KLF15, LIPE, LPL, PPARG, PPARGC1A (PGC-1a), RETN, SIRT3, SLC2A4 (GLUT4), SREBF1</i>
Гены-регуляторы адипогенеза	Проадипогенные гены	<i>ACACB, AXIN1, CCND1, CDK4, CEBPB, CEBPD, DKK1, E2F1, FABP4, FASN, FGF1, FGF2, IRS2, JUN, LMNA, LPL, PPARG, RXRA, SFRP1, SFRP5, SLC2A4 (GLUT4), WNT5B</i>
	Антиадипогенные гены	<i>ADRB2, CDKN1A, CDKN1B, DDIT3, DLK1, FOXO1, HES1, LRP5, NCOR2, RUNX1T1, SHH, SIRT1, SIRT2, TAZ, TCF7L2, TSC22D3, VDR, WNT1, WNT3A</i>
	Гены-регуляторы белой жировой ткани	<i>BMP2, BMP4, CEBPA, EGR2, FGF10, KLF15, KLF4, SREBF1</i>
	Гены-супрессоры белой жировой ткани	<i>GATA2, GATA3, KLF2, KLF</i>
	Гены-регуляторы бурой жировой ткани	<i>BMP7, CREB1, DIO2, FOXC2, INSR, IRS1, MAPK14, NRF1, PPARA, PPARD, PPARGC1A (PGC-1a), PPARGC1B (PGC-1β), PRDM16, SIRT3, SRC, UCPI1, WNT5A</i>
	Гены-супрессоры бурой жировой ткани	<i>NCOA2, NR0B2, NR1H3, RB1, TWIST1, WNT10B</i>

Список проанализированных генов остеогенной дифференцировки представлен в Таблице 24.

Таблица 24 — Список генов, участвующих в остеогенной дифференцировке и проанализированных в ММСК под воздействием мутаций гена *LMNA*

Гены, участвующие в процессе остеогенной дифференцировки ММСК		
Развитие скелета	Формирование хряща	<i>BMP1, BMPR1B, COL2A1, SOX9</i>
	Осификация	<i>ACVR1, AHSG, BGLAP (Osteocalcin), BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, CDH11, CHRDL, COL1A1, COL2A1, CSF1 (MCSF), CTSK, DLX5, EGFR, FGF2 (bFGF), FGFR2, GDF10 (BMP3B), GLI1, IGF1, IGF1R, IGF2, IHH, MMP2, MMP8,</i>

Гены, участвующие в процессе остеогенной дифференцировки ММСК		
		<i>MMP9, NOG, RUNX2, SMAD1, SMAD3, SOX9, SP7, SPP1 (Osteopontin), TGFB1, TGFB2, TGFB3, TNFSF11, TWIST1</i>
	Дифференцировка остеокластов	<i>BGLAP (Osteocalcin), CSF1 (MCSF), TNF, TNFSF11</i>
	Дифференцировка остеобластов	<i>ACVR1, BGLAP (Osteocalcin), BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, CHRDL, COL1A1, DLX5, FGF2 (bFGF), FGFR2, GDF10 (BMP3B), GLI1, IGF1, IHH, NOG, RUNX2, SMAD1, SMAD3, SP7, SPP1 (Osteopontin), TWIST1</i>
	Другие гены	<i>ALPL, COMP, FGFR1, TGFBRI, TGFBRII</i>
Метаболизм костной минерализации	Костная минерализация	<i>ACVR1, AHSR, BGLAP (Osteocalcin), BMP2, BMP4, BMP6, BMP7, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2, FGFR2, IGF1, SMAD3, SOX9, TGFB1, TGFB3, TWIST1</i>
	Кальциевый гомеостаз	<i>ANXA5, BGLAP (Osteocalcin), CALCR, CDH11, COMP, EGF, FGF2 (bFGF), ITGB1, MMP2, MMP8, TGFB1, VDR</i>
Компоненты внеклеточного матрикса	Коллаген	<i>COL10A1, COL14A1, COL15A1, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL5A1</i>
	Ингибиторы протеаз внеклеточного матрикса	<i>AHSR, SERPINH1</i>
	Протеазы внеклеточного матрикса	<i>CTSK, MMP10, MMP2, MMP8, MMP9, PHEX</i>
	Другие гены	<i>ALPL, BGN, FLT1</i>
Молекулы клеточной адгезии	Молекулы межклеточной адгезии	<i>BMP1, BMPR1B, CDH11, COL14A1, COL2A1, EGFR, ICAM1, IHH, ITGB1, SOX9, TGFB1, TNF, TNFSF11, VCAM1</i>
	Клеточно-матриксная адгезия	<i>CD36, COL3A1, CSF1 (MCSF), ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGAM, ITGB1, SMAD3</i>
	Другие гены	<i>BGLAP (Osteocalcin), COL15A1, COL5A1, COMP, FN1, TNF</i>
Регуляторные гены	Ростовые факторы	<i>CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EGF, FGF1, FGF2 (bFGF), GDF10 (BMP3B), IGF1, IGF2, PDGFA, VEGFA, VEGFB</i>
	Транскрипционные факторы	<i>GLI1, NFKB1, RUNX2, SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD5, SOX9, TWIST1</i>

Мы выявили, что в ходе адипогенной дифференцировки ММСК уровень экспрессии 29 из 84 генов значительно изменялся под воздействием мутантных форм ламина по сравнению с ламинем дикого типа. Уровень экспрессии 11 из этих генов изменялся под воздействием мутации R482L, 5 — под воздействием мутации G465D, 7 — под воздействием мутации G232E, 6 и 9 — под воздействием мутаций

R471C и R527C соответственно (Таблица 25). Каждая мутация *LMNA* вызывала уникальное изменение профиля экспрессии. Только для 3 генов (*CFD*, *BMP2* и *ADIPOQ*) отмечено одновременное изменение уровня экспрессии под воздействием двух из исследуемых групп мутаций (миогенных, ЧСЛД-ассоциированных и МАД-ассоциированных), и только для одного гена, *ADIPOQ* — сходный во всех трех группах эффект.



ADIPO DIFF	R482L		G465D		R471C		R527C		R232E	
	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val
LEP	–	–	–	–	–	–	2,81	$9,80 \times 10^{02}$	–	–
LMNA	–	–	–	–	–	–	–	–	1,93	$3,19 \times 10^{03}$
NCOR2	–	–	–	–	2,52	$7,49 \times 10^{02}$	–	–	–	–
NR0B2	4,12	$5,78 \times 10^{04}$	2,99	$4,24 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
PPARG	–	–	–	–	1,61	$5,81 \times 10^{02}$	–	–	–	–
PRDM16	–	–	–	–	0,60	$8,81 \times 10^{02}$	1,72	$3,99 \times 10^{02}$	–	–
RETN	2,01	$8,93 \times 10^{04}$	–	–	–	–	–	–	–	–
SFRP5	2,63	$1,34 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–	–	–
SHH	1,74	$5,04 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–	–	–
UCP1	–	–	–	–	–	–	–	–	2,59	$6,40 \times 10^{02}$
VDR	–	–	–	–	–	–	0,65	$6,72 \times 10^{02}$	–	–
WNT5B	–	–	–	–	–	–	0,51	$3,45 \times 10^{02}$	–	–



Для дальнейшего изучения влияния мутаций *LMNA* на процесс тканеспецифичной дифференцировки ММСК мы применили аналогичный подход и провели анализ экспрессии 84 генов, участвующих в остеогенезе. По аналогии с эффектом, наблюдаемым при адипогенной дифференцировке, для каждой мутации *LMNA* был отмечен уникальный профиль дифференциально экспрессирующихся генов (Таблица 26). Таким образом, эффект различных мутаций *LMNA* на экспрессию генов в ходе остеогенной дифференцировки имеет специфичный для каждой мутации характер и ассоциирован с клиническим проявлением мутаций.

Таблица 26 — Гены, дифференциально экспрессирующиеся в процессе остеогенной дифференцировки ММСК под влиянием различных мутаций гена ламина А/С

OSTEO DIFF	R482L		G465D		R471C		R527C		R232E	
	Кратность изменени я	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val
ACTB	–	–	–	–	–	–	0,61	$4,18 \times 10^{02}$	–	–
ACVR1	2,39	$7,85 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–	–	–
BGLAP	–	–	1,84	$7,78 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
BGN	–	–	1,78	$4,36 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
BMP1	1,79	$7,99 \times 10^{02}$	1,90	$8,31 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
BMP2	2,42	$3,16 \times 10^{02}$	1,87	$4,39 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
BMP3	–	–	–	–	0,43	$4,79 \times 10^{02}$	–	–	–	–
BMP4	–	–	2,37	$4,56 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
CALCR	–	–	3,58	$9,99 \times 10^{02}$	–	–	2,46	$1,44 \times 10^{02}$	–	–
CD36	–	–	2,02	$1,10 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
CDH11	–	–	–	–	–	–	0,55	$9,04 \times 10^{02}$	–	–
CHRD	4,27	$3,20 \times 10^{04}$	3,88	$9,04 \times 10^{04}$	–	–	–	–	2,42	$9,85 \times 10^{02}$
COL14A1	–	–	–	–	–	–	0,36	$6,44 \times 10^{02}$	–	–
COL1A1	1,88	$6,87 \times 10^{02}$	2,26	$9,38 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
COL1A2	–	–	1,64	$8,37 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
COL2A1	–	–	–	–	–	–	0,28	$1,35 \times 10^{02}$	–	–
COL5A1	2,38	$8,88 \times 10^{03}$	2,49	$7,81 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–

OSTEO DIFF	R482L		G465D		R471C		R527C		R232E	
	Кратность изменени я	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val
COMP	–	–	2,28	$2,25 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
CSF1	1,75	$8,08 \times 10^{02}$	–	–	–	–	2,20	$8,69 \times 10^{03}$	–	–
CSF2	–	–	–	–	–	–	5,29	$1,88 \times 10^{04}$	–	–
CSF3	–	–	–	–	–	–	36,76	$9,86 \times 10^{03}$	–	–
EGF	–	–	0,21	$1,12 \times 10^{02}$	–	–	0,17	$4,30 \times 10^{02}$	0,19	$9,17 \times 10^{03}$
EGFR	–	–	1,65	$4,58 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
FGF1	–	–	1,59	$4,49 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
FGFR1	–	–	2,11	$4,28 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
FN1	–	–	1,56	$6,19 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
GAPDH	–	–	1,96	$6,92 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
GLI1	–	–	0,31	$3,40 \times 10^{03}$	0,45	$1,47 \times 10^{04}$	0,14	$6,59 \times 10^{02}$	0,19	$4,49 \times 10^{02}$
ICAM1	–	–	–	–	–	–	3,32	$1,13 \times 10^{03}$	–	–
IGF1R	–	–	1,79	$2,47 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
ITGA2	–	–	2,22	$6,61 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
ITGA3	–	–	1,93	$2,50 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
ITGAM	0,45	$4,02 \times 10^{02}$	–	–	–	–	0,39	$5,62 \times 10^{03}$	0,35	$6,84 \times 10^{04}$
ITGB1	–	–	–	–	–	–	0,57	$4,01 \times 10^{02}$	–	–
MMP10	–	–	0,23	$7,95 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
MMP2	1,70	$5,96 \times 10^{02}$	1,79	$1,71 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
MMP8	0,53	$5,35 \times 10^{02}$	0,25	$2,21 \times 10^{05}$	–	–	–	–	0,20	$9,99 \times 10^{02}$

OSTEO DIFF	R482L		G465D		R471C		R527C		R232E	
	Кратность изменени я	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val	Кратность изменения	p-val
MMP9	–	–	–	–	–	–	0,44	$3,16 \times 10^{02}$	–	–
NFKB1	–	–	1,62	$1,06 \times 10^{01}$	–	–	–	–	–	–
PHEX	–	–	–	–	0,61	$3,69 \times 10^{02}$	–	–	–	–
SMAD3	3,55	$1,82 \times 10^{02}$	3,09	$1,73 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
TGFB1	–	–	2,22	$1,86 \times 10^{03}$	–	–	–	–	–	–
TGFB3	–	–	1,70	$6,12 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
TGFBR2	–	–	1,57	$5,59 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
TNFSF11	–	–	–	–	0,47	$3,68 \times 10^{02}$	–	–	–	–
TWIST1	–	–	1,86	$2,12 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–
VCAM1	–	–	–	–	0,52	$3,03 \times 10^{02}$	18,32	$2,77 \times 10^{04}$	–	–
VDR	–	–	2,08	$2,44 \times 10^{03}$	–	–	0,51	$3,06 \times 10^{03}$	–	–
VEGFB	–	–	1,60	$3,12 \times 10^{02}$	–	–	–	–	–	–

Применение метода иерархической кластеризации показало, что мутации, приводящие к одинаковым клиническим фенотипам, часто вызывают сходное изменение профиля экспрессии (Рисунок 39а, б).

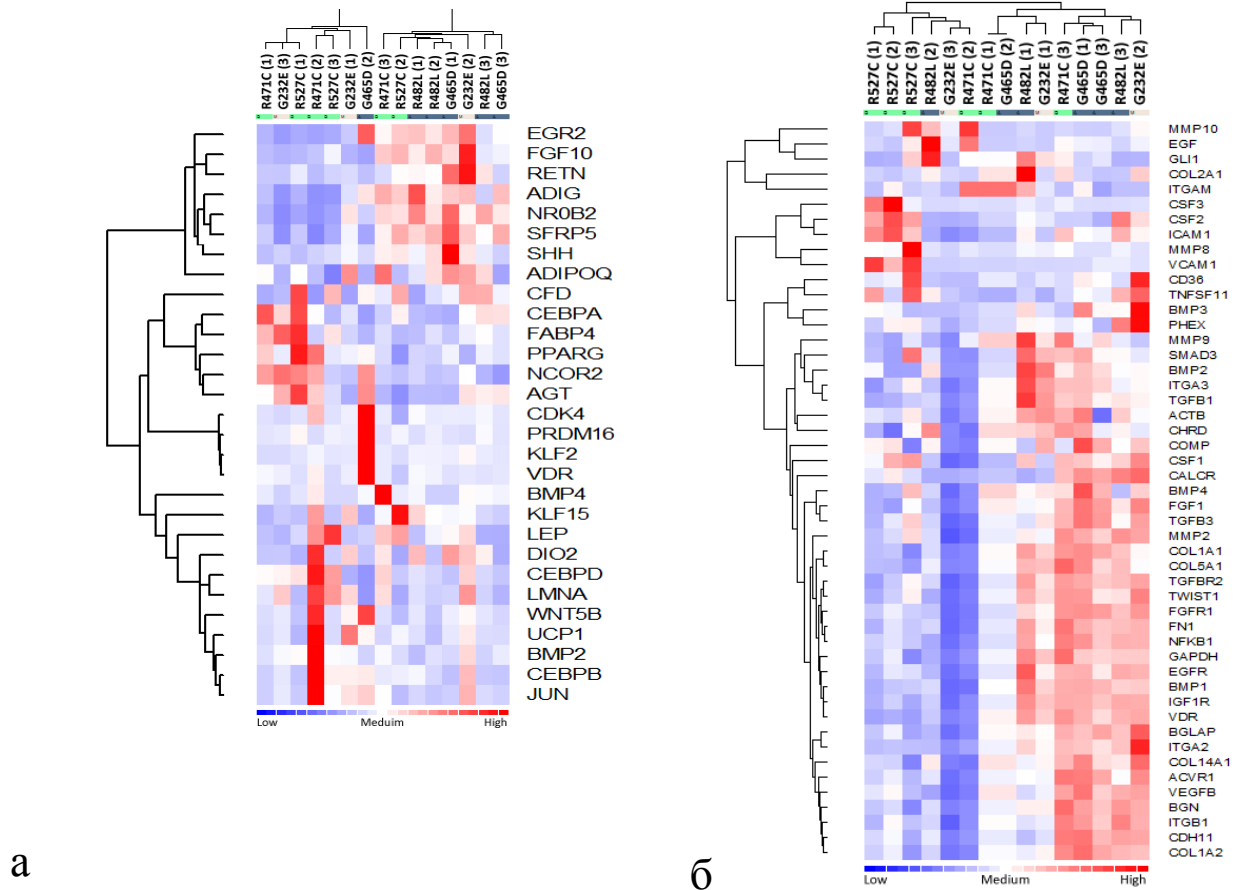


Рисунок 39 — Кластеризация дифференциально-экспрессирующихся генов под воздействием различных мутаций гена ламина А/С. Уровень экспрессии нормализован и отражен различными цветами, красный цвет — усиление экспрессии, синий — снижение экспрессии. Цифры в скобках отражают количество биологических повторов. Колонки соответствуют различным мутациям, например R482L (2) соответствует мутации R482L, количество биологических повторов — 2: (а) — адипогенная дифференцировка; (б) — остеогенная дифференцировка

В частности, мутации, связанные с ЧСЛД, имеют противоположный эффект в отношении экспрессии тканеспецифичных генов по сравнению с МАД-ассоциированными мутациями. Для мутации G232E, ассоциированной с поражением мышечной ткани, выявлен промежуточный профиль изменения экспрессии по сравнению с мутациями ЧСЛД и МАД. Таким образом, изменения в экспрессии генов под воздействием различных мутаций *LMNA* имеют специфичный для каждой мутации характер и ассоциированы с фенотипическими проявлениями мутаций.

### **8.7. Оценка влияния мутаций гена *LMNA* на дифференцировку сателлитных мышечных клеток в миогенном направлении и формирование миотрубок**

Дальнейшие эксперименты были направлены на оценку влияния мутаций гена ламина LMNAG232E и LMNAR571S на процесс миогенеза и формирования зрелого мышечного волокна в модели первичных сателлитных клеток мышцы, выделенных из *m. soleus*. Сателлитные клетки трансдуцировали вирусом, несущим ген ламина дикого типа LMNAWT или мутантные формы LMNAG232E или LMNAR571S, после чего клетки дифференцировали в среде с низким содержанием сыворотки в течение семи дней. Данные мутации были выбраны для исследования в связи с их ассоциацией с развитием кардиомиопатии и миопатии. В процессе дифференцировки наблюдалось слияние клеток и формирование миотрубок. Морфологию миотрубок оценивали по результатам иммуноцитохимического окрашивания антителами к десмину и тяжелым цепям миозина (Рисунок 40). В качестве контроля использовали миотрубки, экспрессирующие эндогенную форму ламина (миотрубки, образованные нетрансдуцированными сателлитными клетками) или экзогенный ламилин дикого типа (миотрубки, образованные сателлитными клетками, трансдуцированными LMNAWT).

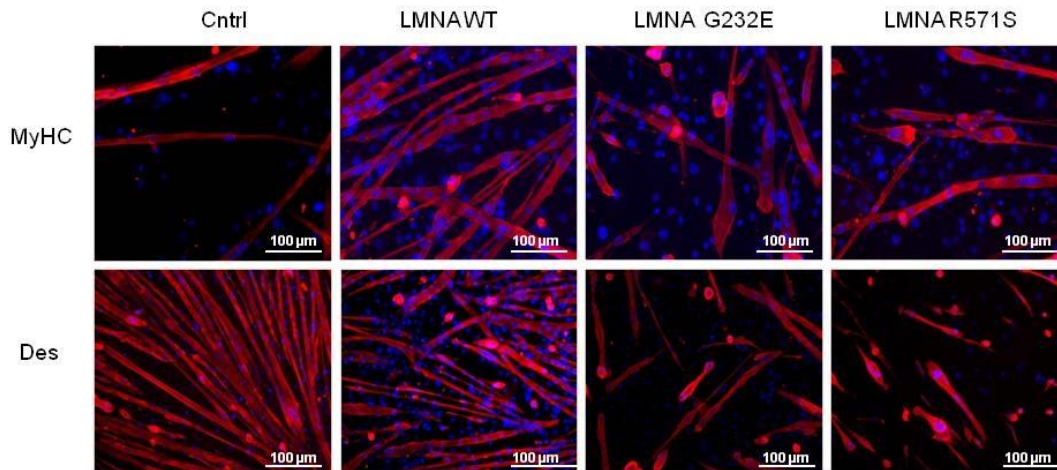


Рисунок 40 — Иммуноцитохимическое окрашивание миотрубок, образованных сателлитными клетками, экспрессирующими разные формы ламина. Окрашивание на десмин (Des) и тяжелые цепи миозина (Myhc) (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Мутантные миотрубки характеризуются меньшей длиной и нарушенным процессом расхождения ядер к полюсам

В результате анализа массива микрофотографий было выявлено, что клетки, экспрессирующие мутантные формы ламина, образуют более короткие миотрубки, а также миотрубки, в которых нарушен процесс расхождения ядер к полюсам. Для количественной оценки процесса миогенеза измерялась длина миотрубок, сформированных нетрансдуцированными клетками и клетками, экспрессирующими мутантные формы *LMNA* (Рисунок 41). Миотрубки были разделены на несколько групп в зависимости от количества инкорпорированных в них ядер. Нами было показано, что миотрубки, экспрессирующие эндогенный ламин или экзогенный ламин дикого типа, в большинстве случаев имеют вытянутую форму и в 65–70% случаев включают более 15 ядер. В то же время 60% миотрубок, экспрессирующих мутантную форму ламина *LMNA R571S*, ассоциированную с развитием кардиомиопатии, включали 5–10 ядер, а миотрубки, экспрессирующие мутантную форму ламина *LMNA G232E*, ассоциированную с миопатией, были самыми короткими и включали 1–2 ядра.

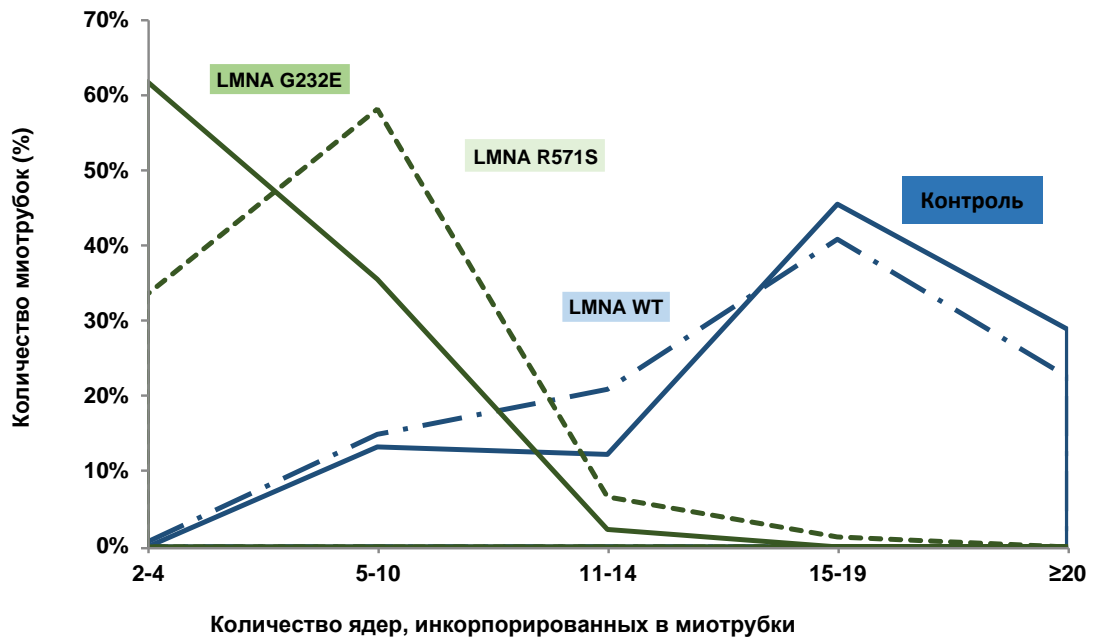


Рисунок 41 — Распределение миотрубок по количеству содержащихся в них ядер.

Миотрубки, экспрессирующие эндогенный ламин ( $n = 120$  миотрубок) и экзогенный ламин дикого типа ( $n = 120$  миотрубок), характеризуются большим количеством инкорпорированных в них ядер, большая часть клеток содержит 15–19 ядер. Миотрубки с мутантной формой ламина R517S ( $n = 74$  миотрубки) содержат заметно меньшее количество, 5–10 ядер, а с мутацией G232E ( $n = 62$  миотрубки) содержат преимущественно 2–4 ядра

Поскольку одним из основных механизмов, обеспечивающих формирование миотрубок в процессе миогенеза и кардиомиогенеза, является слияние отдельных миобластов в многоядерные мышечные волокна, нарушение данного процесса может являться одним из факторов несовершенного формирования миотрубок. Для оценки эффективности процесса слияния клеток был посчитан индекс слияния. Индекс слияния =  $(N \text{ ядер, инкорпорированных в миотрубки} / N \text{ всех ядер в поле зрения}) \times 100\%$ . В нетрансдуцированных клетках и клетках, трансдуцированных LMNAWT, индексы слияния не отличались,  $47,99 \pm 0,45\%$  и  $46,97 \pm 1,49\%$  соответственно (Рисунок 42). При этом индексы слияния клеток, экспрессирующих мутантные формы LMNA, были значительно ниже —  $17,98 \pm 1,83$  и  $12,42 \pm 4,24$  для R571S и G232E соответственно.



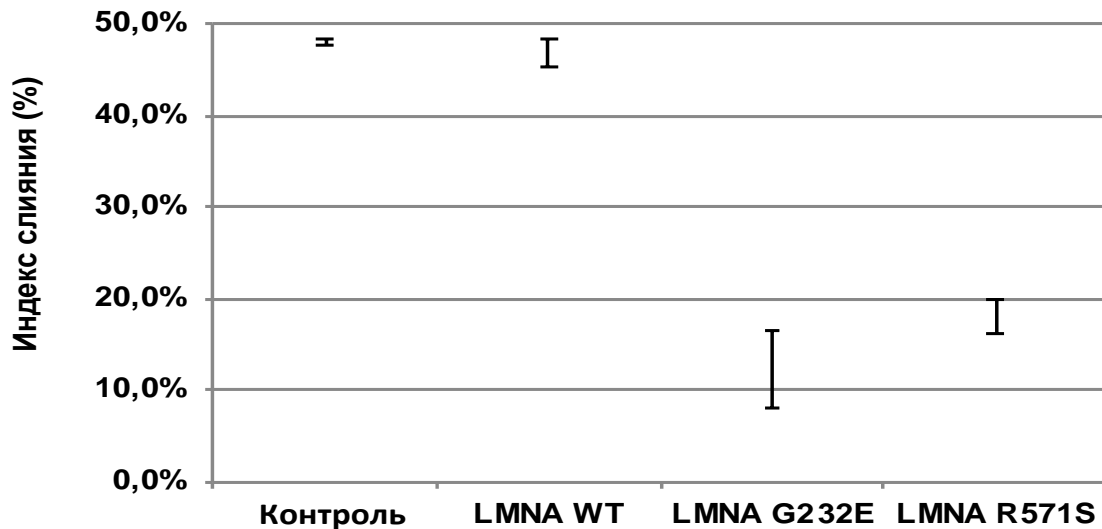


Рисунок 42 — Индекс слияния миотрубок, образованных сателлитными клетками, экспрессирующими разные формы ламина. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  SD (количество проанализированных миотрубок: контроль — 120, LMNAWT — 120, LMNAG232E — 62, LMNAR571S — 74)

При детальном анализе морфологии миотрубок, несущих разные формы гена LMNA, были обнаружены «анормальные» миотрубки, в которых был нарушен процесс расхождения ядер к полюсам (Рисунок 43а). Показано, что в отличие от эффекта трансдукции LMNAWT, при котором количество аномальных миотрубок составляет всего  $6,94 \pm 2,16\%$  и не отличается статистически от соответствующего показателя в интактных клетках, при трансдукции мутантной формой LMNAG232E количество аномальных миотрубок составляет  $61,65 \pm 6,23\%$  от общего числа миотрубок, а в случае мутации LMNAR571S —  $64,68 \pm 4,62\%$  (Рисунок 43б). Таким образом, мутации гена LMNA ассоциированы с нарушением формирования миотрубок и расхождения ядер к полюсам.

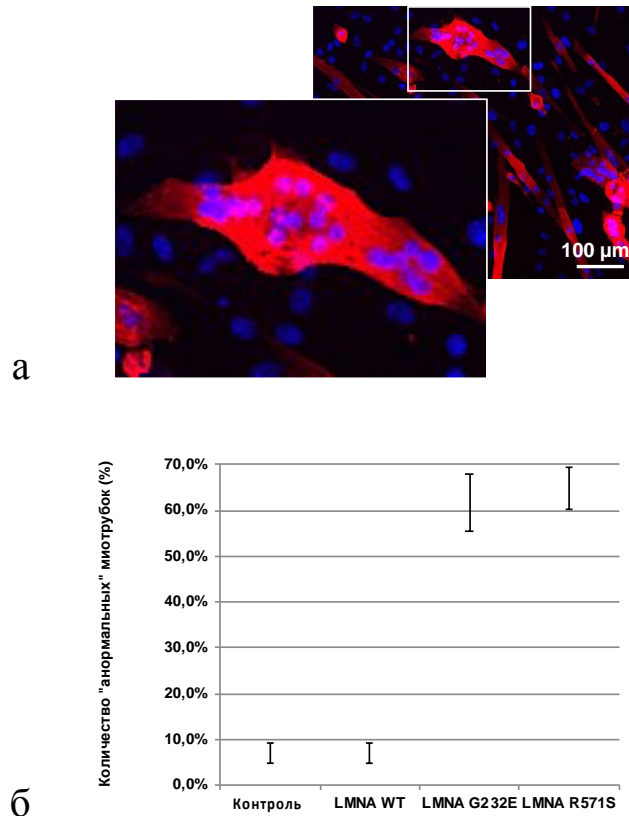


Рисунок 43 — Влияние мутаций в гене ламина на формирование миотрубок и расхождение ядер к полюсам:

(а) — пример «аномальной» миотрубки. Окрашивание антителами к десмину (красный цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет); (б) — количество «аномальных» миотрубок, сформированных сателлитными клетками, экспрессирующими мутантные формы ламина. Данные представлены в виде средних значений  $\pm$  SD (количество проанализированных миотрубок: контроль — 120, LMNAWT — 120, LMNAG232E — 62, LMNAR571S — 74)

### 8.8. Влияние мутаций *LMNA* на экспрессию маркеров миогенной дифференцировки

На следующем этапе работы мы провели оценку влияния мутаций гена ламина на экспрессию ряда основных факторов миогенной дифференцировки: *Six1*, *Pax3*, *Pax7*, *Myf5*, *Myotaker*, *MyoD*, *MyoG*, *Myh4*, *Mrf4*. Оценку экспрессии

проводили в культуре мышечных миобластов линии C2C12. Клетки линии C2C12 были трансдуцированы лентивирусными конструкциями, несущим ген ламина дикого типа или мутантные его формы (LMNAWT, LMNAR571S, LMNAG232E). Количественную оценку маркеров дифференцировки проводили через 24 часа и через семь суток от начала дифференцировки. Эксперименты были проведены в пяти биологических повторах (Рисунок 44).

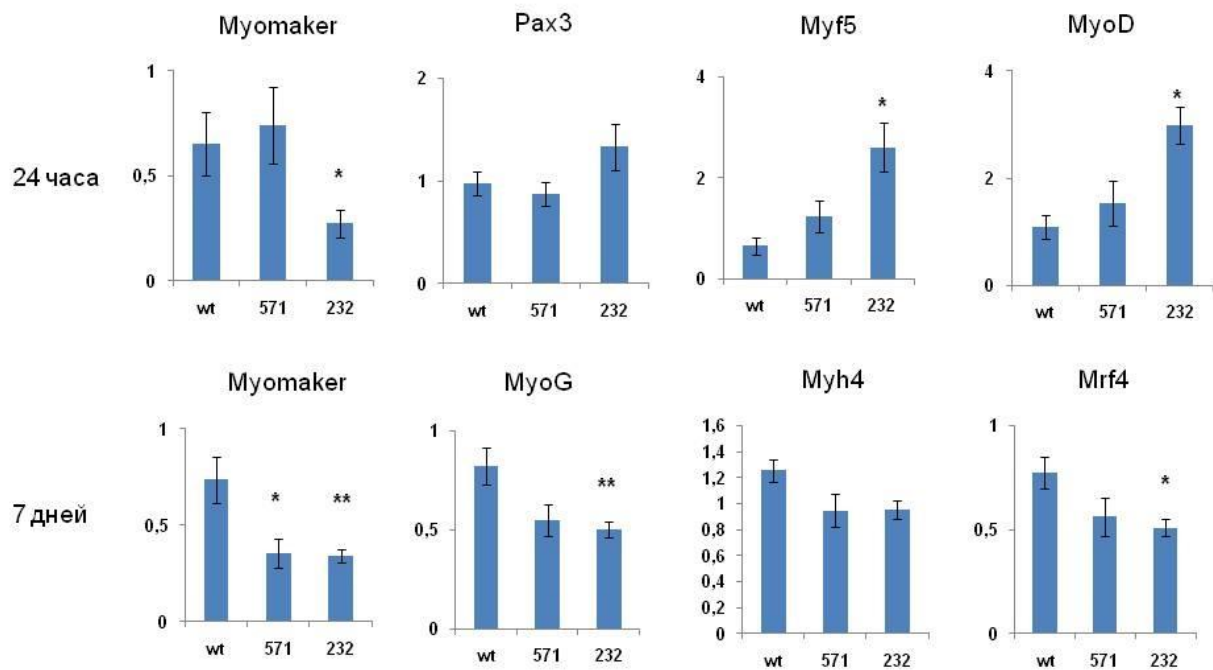


Рисунок 44 — Динамика экспрессии основных генов миогенеза в миобластах линии C2C12. По оси ординат указано относительное количество мРНК для каждого гена, измеренное по методу 2-ΔΔСТ, и нормированное на образец LMNAWT. Данные представлены в виде средних значений по 4–6 биологическим повторам ± SEM.

\* —  $p < 0,1$ ; \*\* —  $p < 0,05$ ; wt — LMNAWT; 571 — LMNAR571S; 232 — LMNAG232E

Наиболее значимый результат был получен в отношении экспрессии гена *Myomaker*. На фоне мутации LMNAG232E экспрессия гена *Myomaker* была значимо

снижена в 2,4 раза ( $p < 0,01$ ) через 24 часа и в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) через семь дней дифференцировки относительно уровня его экспрессии в клетках, трансдуцированных LMNAWT. На конечной стадии дифференцировки, через семь суток, экспрессия *Myomaker* была также снижена в 2,1 раз и в клетках, несущих мутацию LMNAR571S ( $p < 0,01$ ).

Кроме того, в клетках, несущих мутацию LMNAG232E, значимо менялся уровень экспрессии генов *Myf5* и *MyoD* по сравнению с клетками, трансдуцированными LMNAWT. Так, через сутки после начала дифференцировки клеток с этой мутацией, экспрессия *Myf5* и *MyoD* была значимо выше, в 3,9 и 2,7 раз ( $p < 0,01$ ) соответственно. В этих же клетках на поздних сроках дифференцировки наблюдалось достоверное снижение уровня экспрессии поздних маркеров миодифференцировки — генов *MyoG* и *Mrf4* в 1,6 ( $p < 0,05$ ) и в 1,5 раз ( $p < 0,01$ ) соответственно, по сравнению с клетками, трансдуцированными LMNAWT.

### 8.9. Эффект мутаций *LMNA* на активность гистондеацетилазы

Одним из предполагаемых механизмов, с помощью которых ядерная ламина влияет на транскрипцию и экспрессию генов в процессе дифференцировки, является участие белков ядерной ламины в организации хроматина посредством взаимодействия с факторами эпигенетического контроля, в частности гистоновыми деацетилазами (HDAC). В связи с этим нами была исследована базальная активность гистоновых деацетилаз в недифференцированных ММСК, модифицированных различными мутантными формами *LMNA*. Общая активность гистоновых деацетилаз увеличивалась в клетках, несущих любые мутации *LMNA* по сравнению с клетками, трансдуцированными геном ламина дикого типа (Рисунок 45).

Таким образом, введение различных мутантных форм *LMNA* вызывает увеличение общей активности гистоновых деацетилаз в недифференцированных ММСК.

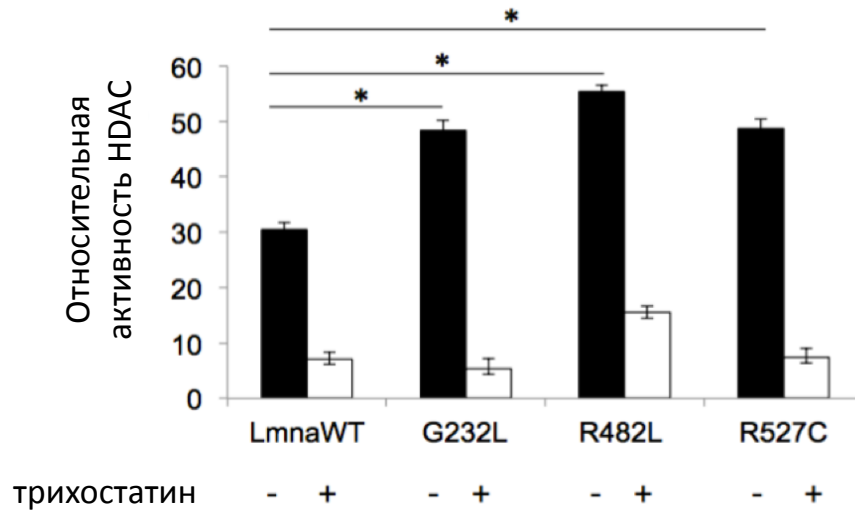


Рисунок 45 — Изменение общей активности гистоновых деацетилаз под воздействием различных мутаций гена ламина А/С. Активность гистоновых деацетилаз (HDAC) оценивалась в неиндуцированных к дифференцировке ММСК, трансдуцированных различными мутациями *LMNA*.

\* — уровень значимости  $P < 0,05$

## Глава 9. ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ РАЗВИТИЯ КАРДИОМИОПАТИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МУТАЦИЯМИ ГЕНА ТРОПОНИНА I (*TNNI3*)

### 9.1. Клиническая картина РКМП на фоне мутаций в гене *TNNI3*

Ген тропонина I (*TNNI3*) до настоящего времени считался основным геном, ассоциированным с РКМП, и мутации в нем составляли до 30% причин развития РКМП. В данном исследовании нами верифицировано 4 патогенных варианта в гене *TNNI3*, что составляет 11% всех пациентов обследованной группы. Все выявленные патогенные и вероятно-патогенные варианты в гене *TNNI3* приводили к дебюту заболевания в детском возрасте, в 2 из описанных 4 случаев причиной смерти пациентов являлась ВС. Ни у кого из пациентов с патогенными вариантами в гене *TNNI3* не наблюдались признаки фенотипической трансформации РКМП, сочетание с ВПС или НЛЖ. Среди пациентов с *TNNI3*-ассоциированной РКМП семейных случаев заболевания также выявлено не было. Основные клинические данные пациентов с причинными мутациями в гене *TNNI3* приведены в Таблице 27 и описаны ниже в виде отдельных клинических случаев.

Таблица 27 — Клиническая характеристика когорты пациентов с РКМП, ассоциированной с патогенными вариантами в гене *TNNI3*

Пациент	Возраст дебюта РКМП	Семейный анамнез	Позиция и аминокислотная замена по GRCh37	Признаки фенотипической трансформации РКМП	Длительность наблюдения от момента постановки диагноза	Причины достижения конечной точки
5	15 лет	–	Chr19: 55663260:G>A NM_000363: <b>R192H</b>	–	1 год	ВС
20	12 лет	+ (ВС отца в возрасте 29 лет)	Chr19: 55665445:G>- NM_000363.4: c.[5026delG],p.D168TfsTer8	–	11 лет	Рефрактерная ХСН
21	8 мес.	–	Chr: 19:55665439:G>A NM_000363: <b>R170W</b>	–	1 год	Рефрактерная ХСН
28	2 года	–	Chr: 19:55665439:G>A NM_000363: <b>R170G</b>	–	2 года	ВС

ВС — внезапная смерть, ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

### Клинический случай 1 (Таблица 27, пациент 20)

У пациентки с 12 лет отмечались частые инфекции дыхательных путей, регистрировались синкопальные состояния и выраженная одышка при физической нагрузке, был заподозрен порок сердца без детального клинического и функционального обследования. Диагноз РКМП был поставлен по результатам ЭхоКГ в возрасте 16 лет. Первые признаки застойной сердечной недостаточности появились в возрасте 20 лет, в то же время пациентка стала отмечать спонтанные приступы загрудинных болей. В течение последующих лет наблюдалось концентрическое ремоделирование левого желудочка с нарушением диастолической функции, возрастанием легочной гипертензии, прогрессирующим увеличением левого предсердия и снижением конечно-диастолического размера левого желудочка (Таблица 28). Систолическая функция левого желудочка оставалась сохранной в течение всего периода наблюдения. В возрасте 20 лет у пациентки была зарегистрирована постоянная форма трепетания предсердий с нерегулярным проведением (2:1, 4:1). Пациентка умерла в возрасте 23 лет в связи с прогрессирующей рефрактерной сердечной недостаточностью.

Таблица 28 — Данные ЭхоКГ пробанда с РКМП на фоне мутации в гене *TNNI3*.

Показатель	16 лет	17 лет	19 лет	20 лет	22 года
КСРЛЖ, мм	24	28	27	21	19
КДРЛЖ, мм	38	38	35	34	32
МЖПд, мм	11	10	10	9	8
ЗСЛЖд, мм	11	10	10	11	10
ЛП, мм	54	55	66	84	100
ПП, мм	21/42	23/54	38/74	56,2/77	60/78
ЛАд, мм рт. ст.	28	28	38	58	51
МЖП/ЗСЛЖ	1	1	1	1	0,8
ЛЖм, г	145	132	114	107	81
ИМЛЖ, г/М <sup>2</sup>	99	91	80	74	54
ФВ/ФУ	66/35	66/35	78/36	78/37	78/38

КСРЛЖ — конечно-систолический размер левого желудочка; КДРЛЖ — конечно-диастолический размер левого желудочка; МЖПд — межжелудочковая перегородка в диастолу; ЗСЛЖд — задняя стенка левого желудочка в диастолу; ЛП — размер левого предсердия; ПП — размер правого предсердия; ЛАд — расчетное систолическое давление в легочной артерии; ЛЖм — масса левого желудочка; ИМЛЖ — индекс массы левого желудочка; ФВ — фракция выброса левого желудочка (по формуле Симпсон); ФС — фракция укорочения левого желудочка.

При сборе семейного анамнеза и обследовании родственников выяснилось, что отец пробанда также умер от внезапной остановки сердца в возрасте 29 лет (Рисунок 46). Последние три года своей жизни он страдал от прогрессирующей сердечной недостаточности с фибрилляцией предсердий. У двух членов семьи (II:2 и III:3), включая пробанда, были эпизоды внутриутробной гибели плода в третьем триместре, два члена семьи умерли внезапно в младенческом возрасте (III:1 и III:2).

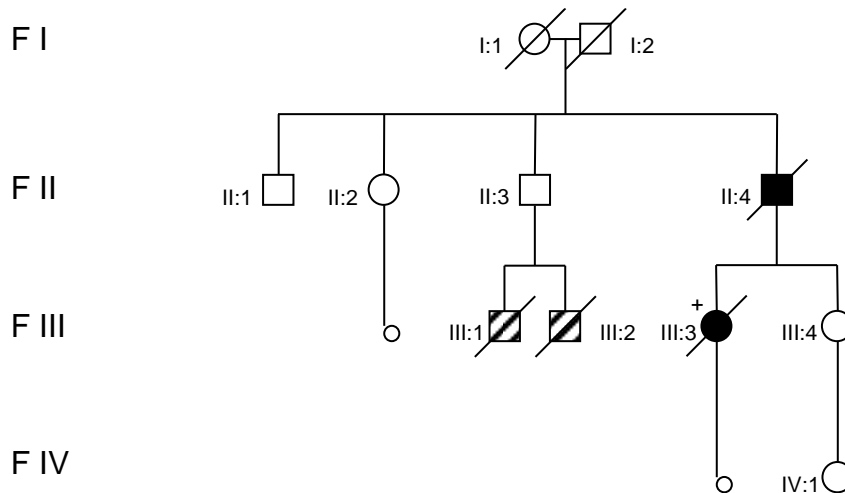


Рисунок 46 — Генеалогическое древо пациентки с РКМП

Первичное генетическое обследование пациентки проводилось в 2002 году. На тот момент в качестве генетических причин идиопатической РКМП были известны гены *DES* и *TNNI3*. Секвенирование по Сенгеру не выявило мутаций в гене *DES*. При секвенировании гена *TNNI3* была выявлена однонуклеотидная делеция в 7 экзоне с.[5026delG], p.D168TfsTer8, приводящая к сдвигу рамки считывания и формированию терминирующего кодона (Рисунок 47). Данная замена не была обнаружена ни у кого из здоровых и доступных для генетического анализа членов семьи. ДНК ни одного из родственников, имеющих сходную картину заболевания, не была доступна, в связи с этим достоверно проверить факт сегрегации выявленного генетического варианта не представлялось возможным.



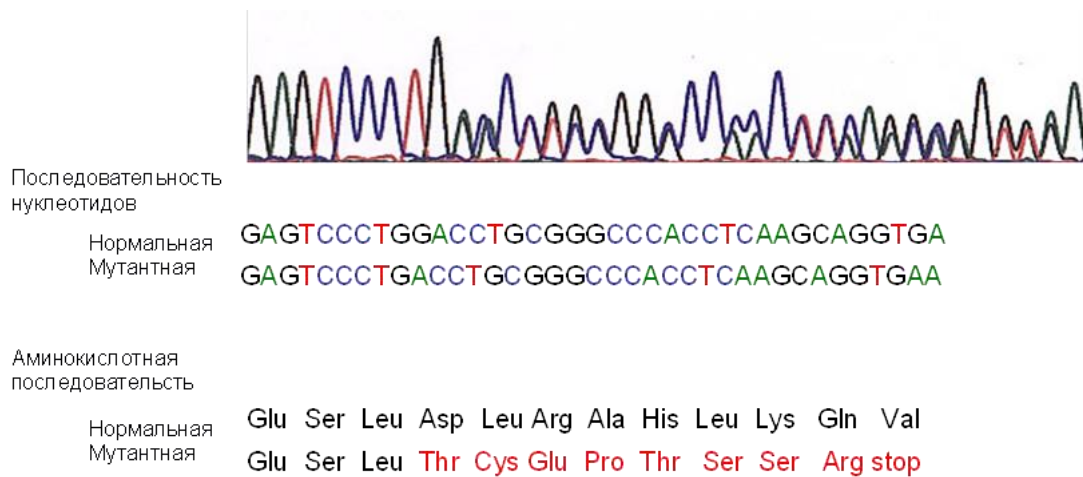


Рисунок 47 — Мутация в 7 экзоне гена *TNNT3* с.[5026delG], p.D168TfsTer8

С учетом характера выявленной нуклеотидной замены (сдвиг рамки считывания) для подтверждения функционального ее эффекта нами было проведено исследование образца папиллярной мышцы миокарда пациентки, полученного при аутопсийном исследовании, методом Вестерн-блот. Исследование подтвердило снижение экспрессии белка тропонина I в миокарде по сравнению с контрольным образцом на 50% (Рисунок 48). Несмотря на то, что выявленная мутация предполагает наличие укороченной формы белка длиной 176 аминокислот без оставшихся 57 аминокислот на С-концевой части белка, дополнительного бенда с соответствующей молекулярной массой обнаружено не было, что может являться косвенным свидетельством механизма нонсенс-опосредованной РНК деградации мутантной формы тропонина I. Позднее ДНК пациентки была повторно проанализирована методом массового параллельного секвенирования с применением панели целевого обогащения на 108 генов, ассоциированных с развитием РКМП. Исследование подтвердило наличие единственной замены p.D168TfsTer8 в гене *TNNT3*, которая была классифицирована как патогенная по критериям ACMG с учетом данных, полученных методом Вестерн-блота.

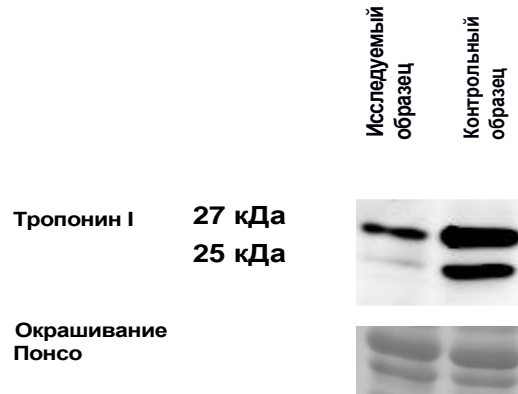


Рисунок 48 — Определение количества белка сердечного тропонина I методом Вестерн-блота. В качестве контроля нагрузки общего количества белка использовалась окраска реагентом Понсо. Количество белка тропонина I с молекулярной массой 27 кДа в миокарде пациента соответствует приблизительно 50% от контроля. Бенд с молекулярным весом 25 кДа соответствует ишемической (станированной) изоформе тропонина I

#### Клинический случай 2 (Таблица 27, пациент 21)

Ребенок 8 месяцев из пары монозиготных близнецов от естественной не ЭКО-индуцированной беременности был консультирован кардиологом в связи с появлением признаков сердечной недостаточности: одышки, быстрой утомляемости и отечного синдрома. По результатам проведенного обследования и данным ЭхоКГ ребенку был поставлен диагноз РКМП. Скрининговое обследование бессимптомной на тот момент сестры-близнеца выявило рестриктивный тип наполнения левого желудочка в возрасте 13 месяцев и привело к постановке диагноза РКМП в возрасте 15 месяцев. Оба ребенка умерли в возрасте 18 и 20 месяцев из-за явлений застойной сердечной недостаточности, резистентной к медикаментозному лечению, на фоне наджелудочковых нарушений ритма. При секвенировании гена *TNNI3* методом Сенгера была выявлена замена R170W в гене *TNNI3* у обеих пациенток. Родители пациенток отказались от проведения генетического исследования, в связи с чем достоверно проверить тип наследования выявленного варианта не представлялось возможным. Позднее ДНК пациенток

была повторно проанализирована методом массового параллельного секвенирования с применением панели целевого обогащения на 108 генов, ассоциированных с развитием РКМП. Исследование подтвердило наличие замены R170W в гене *TNNI3*, которая была расценена как патогенная по критериям ACMG с учетом данных функциональных исследований. В дополнение у обеих пациенток были обнаружены варианты в генах *SCN4B* и *SYNE2*, которые расцениваются как варианты неопределенной значимости в соответствии с классификацией ACMG (Таблица 13).

#### Клинический случай 3 (Таблица 27, пациент 28)

Пациент был впервые обследован в возрасте двух лет в связи с частыми пневмониями и задержкой психомоторного развития. По результатам эхокардиографического обследования пациенту был поставлен диагноз РКМП, биопсия миокарда выявила признаки умеренной гипертрофии кардиомиоцитов и интерстициальный фиброз. В связи с нарастанием явлений сердечной недостаточности пациент был включен в лист ожидания трансплантации сердца. Находясь в листе ожидания, пациент умер в возрасте 4 лет в следствие ВС. На первом этапе генетического обследования секвенирование гена *TNNI3* методом Сенгера выявило замену R170G (Таблица 13). Родители пациента отказались от проведения генетического исследования, в связи с чем достоверно проверить тип наследования варианта не представлялось возможным. Позднее ДНК пациента была повторно проанализирована методом массового параллельного секвенирования с применением панели целевого обогащения на 108 генов, ассоциированных с развитием РКМП. Исследование подтвердило наличие замены R170G в гене *TNNI3*, которая была расценена по критериям ACMG как патогенная с учетом данных функциональных исследований.

#### Клинический случай 4 (Таблица 27, пациент 5)

Пациент 15 лет был обследован в кардиологическом стационаре в связи со случайным выявлением при скрининговом флюорографическом исследовании увеличения размеров предсердий. Проведенная ЭхоКГ подтвердила наличие атриомегалии, рестриктивного типа трансмитрального кровотока, а также

отсутствие значимой гипертрофии миокарда и структурных аномалий сердца. При холтеровском мониторинге желудочковых и наджелудочковых нарушений ритма зарегистрировано не было. На момент обследования пациент не предъявлял жалоб, признаки ХСН соответствовали I ФК. При опросе семейного анамнеза заболеваний сердечно-сосудистой системы выявлено не было. В возрасте 18 лет пациент умер внезапно в момент госпитализации в специализированный стационар, в ходе проведения реанимационных мероприятий документирован аритмогенный характер ВС. Проведенное генетическое обследование методом секвенирования нового поколения с применением панели целевого обогащения на 108 генов, ассоциированных с развитием РКМП выявило наличие замены R192H в гене *TNNI3*, которая была расценена по критериям ACMG как патогенная и неоднократно описана в базе данных ClinVar в связи с развитием РКМП и ГКМП.

## **9.2. Исследование взаимодействия мутантных форм тропонина I с белками тонких филаментов методом коседиментации и плазмонного резонанса**

Учитывая значительную частоту патогенных вариантов гена *TNNI3* среди пациентов с РКМП и ассоциированный с ними неблагоприятный прогноз заболевания, нами был проведен углубленный биофизический анализ молекулярных свойств мутантных форм тропонина I, выявленных в данном исследовании. В частности, нами были проанализированы 2 патогенных варианта с заменами в аминокислотной позиции 170 белка *TNNI3* — R170G и R170W, приводящие к раннему дебюту РКМП в возрасте до 3 лет, развитию ФП и неблагоприятному прогнозу.

Способность мутантных форм тропонина I, cTnI-R170G и cTnI-R170W, интегрироваться в сердечный тропониновый комплекс исследовалась методом коседиментации (Рисунок 49а, б). Для формы тропонина cTnI-R170G не наблюдалось значимого изменения включения в актин-тропониновый комплекс по сравнению с тропонином дикого типа. В то же время для cTnI-R170W наблюдалось

снижение интеграции в тонкие филаменты, что выражалось снижением на 26% включения мутантной формы в актин-тропониновый комплекс.

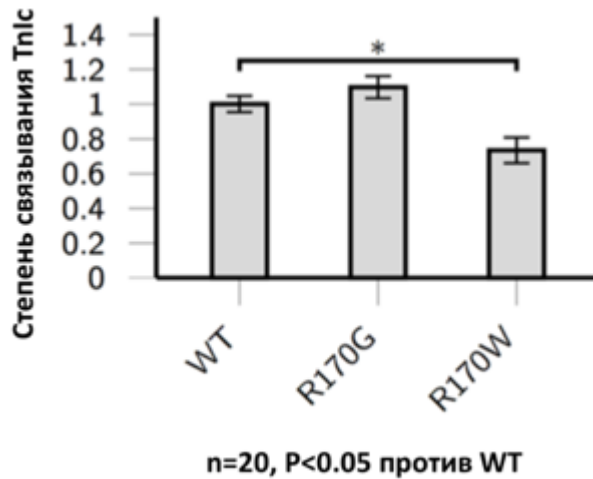
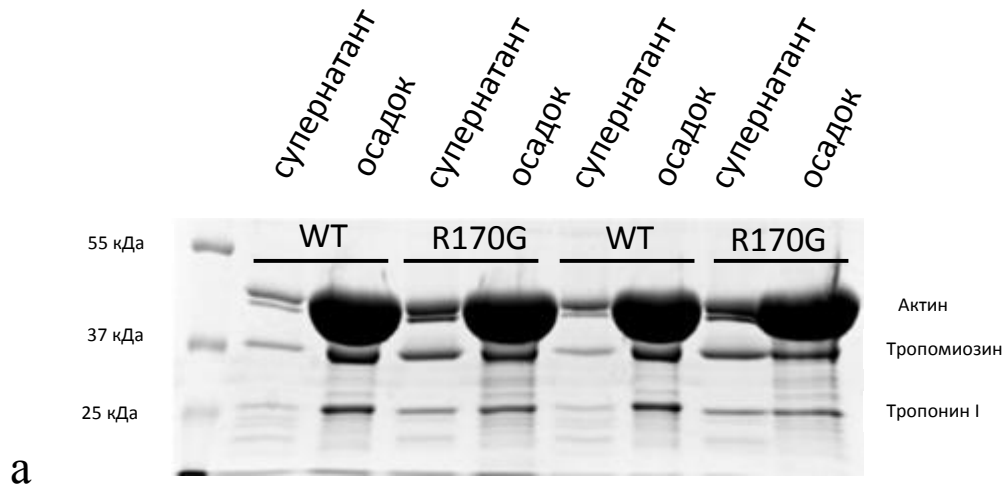


Рисунок 49 — Взаимодействия мутантных форм тропонина I с белками тонких филаментов методом коседиментации:

(а) — электрофорез белков актин-тропонинового комплекса после коседиментации с мутантной формой тропонина сTnI\_R170G; (б) — количество нормальной и мутантных форм сTnI, осажденных в составе комплекса тонких филаментов

Кинетика связывания мутантных форм с актином и тропомиозином также различалась между собой. Связывание с тропомиозином было значительно увеличено в случае обеих мутаций (Таблицы 29, 30), что выражалось в снижении

константы диссоциации, в то время как связывание с глобулярным актином было повышено для сTnI-R170G и незначительно, но достоверно снижено для сTnI-R170W. Таким образом, для обеих мутантных форм тропонина наблюдалось нарушение связывания с актином и тропомиозином и включения в комплекс тонких филаментов.

Таблица 29 — Кинетика связывания сTnI-R170G/W с тропомиозином

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

$\kappa_a[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  — скорость ассоциации,  $\kappa_d[\text{s}^{-1}]$  — скорость диссоциации,  $K_D[\text{мкМ}]$  — константа диссоциации, N — количество экспериментов.

Таблица 30 — Кинетика связывания сTnI-R170G/W с глобулярным актином

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

$\kappa_a[\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}]$  — скорость ассоциации,  $\kappa_d[\text{s}^{-1}]$  — скорость диссоциации,  $K_D[\text{мкМ}]$  — константа диссоциации, N — количество экспериментов.

Изменение константы диссоциации при взаимодействии мутантных форм тропонина с тропомиозином и актином свидетельствует об усилении связывания сTnI-R170G с белками тонких филаментов и незначительном ослаблении взаимодействия с актином для сTnI-R170W.

### 9.3. Оценка активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы

Наблюдаемые нарушения взаимодействия мутантных форм тропонина I сTnI-R170G и сTnI-R170W с актином и тропомиозином могут влиять не только на соотношение белковых молекул внутри актин-тропонин-тропомиозинового

комплекса, но также на взаимодействие с миозиновыми филаментами, актин-миозиновой АТФ-азой и чувствительность к ионам кальция. В связи с этим нами была исследована зависимость активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от концентрации  $Ca^{2+}$  в модели восстановленных тонких филаментов. Введение любой из исследуемых мутантных форм тропонина, cTnI-R170G или cTnI-R170W, в комплекс фибриллярного актина и тропомиозина, сходным образом приводило к сдвигу кривой зависимости активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от  $Ca^{2+}$  вправо, демонстрируя снижение чувствительности к ионам кальция (Рисунок 50). Однако, при исследовании силы сокращения миоцитов, изолированных из миокарда морской свинки после обменного замещения тропонина I на нормальную или мутантные формы сердечного тропонина I человека, напротив, наблюдалось выраженное увеличение силы сокращения при более низких концентрациях ионов кальция (Рисунок 51). Данное расхождение в чувствительности к ионам кальция восстановленных тонких филаментов и изолированных клеток, несущих мутантные формы тропонина I, может быть обусловлено взаимодействием молекул тропонина и тонких филаментов с другими белками миофиламентов, в частности с миозинсвязывающим белком С (MyBPC), который участвует в процессе генерации силы сокращения при исследовании изолированных миоцитов. В связи с этим при повторном исследовании активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы в состав восстановленных филаментов был добавлен N-концевой фрагмент миозинсвязывающего белка С (MyBPC C0–C2). При добавлении MyBPC C0–C2 к восстановленному актин-тропонин-тропомиозиновому комплексу наблюдалось возрастание чувствительности к ионам  $Ca^{2+}$ , регистрируемое как увеличение  $pCa_{50}$  и сдвиг кривой зависимости влево (Рисунок 52). Таким образом, проведенные эксперименты с использованием методов коседиментации и функциональных исследований показали нарушение взаимодействия мутантных форм тропонина cTnI-R170G и cTnI-R170W с актином и тропомиозином, а также связь эффекта мутантного белка в отношении сократимости и активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы с присутствием в системе миозинсвязывающего белка С.

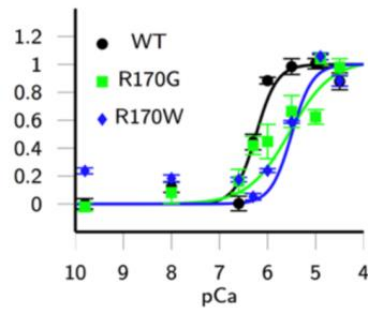


Рисунок 50 — Зависимость активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии нормальных (WT) и мутантных форм тропонина I. сTnI-R170G и сTnI-R170W вызывают снижение чувствительности тонких филаментов к ионам кальция, что отражается сдвигом кривых зависимости вправо

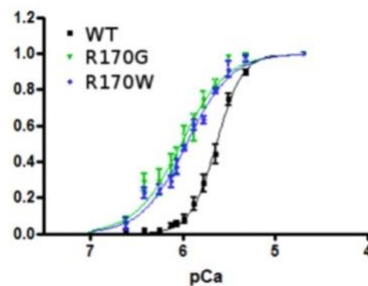


Рисунок 51 — Зависимость силы сокращения изолированных миоцитов от  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии нормальных (WT) и мутантных форм тропонина I. сTnI-R170G и сTnI-R170W вызывают увеличение чувствительности к ионам кальция, что отражается сдвигом кривых зависимости влево

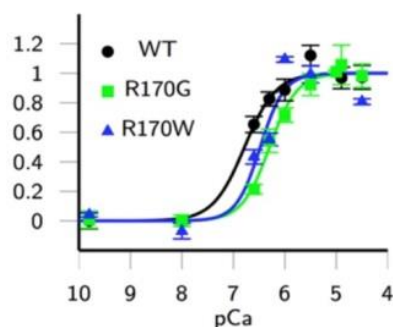


Рисунок 52 — Зависимость активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы от  $\text{Ca}^{2+}$  в присутствии нормальных (WT) и мутантных форм тропонина I и миозинсвязывающего белка С (MyBP-C C0–C2). В присутствии MyBP-C C0–C2 чувствительность актин-миозиновой-S1 АТФ-азы к  $\text{Ca}^{2+}$  восстанавливается



#### 9.4. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа у пациентов с ХСН

Была обследована группа из 334 пациентов с ХСН, 196 из них составляли мужчины (59%) и 138 женщины (41%). Среди причин развития ХСН основными являлись артериальная гипертензия и факторы кардиометаболического риска, а также ИБС. Ожирение 1 степени отмечалось у 75 пациентов (22%), 2 степени — у 36 пациентов (11%), 3 степени — у 18 пациентов (5%). Никто из обследованных пациентов с ХСН не имел перенесенного ИМ в анамнезе, а также рубцовых изменений в миокарде по данным ЭхоКГ. Клиническая характеристика и основные эхокардиографические параметры обследованных пациентов с ХСН представлены в Таблице 31. В качестве контрольной группы были обследованы здоровые доноры в возрасте 18–50 лет.

Таблица 31 — Клиническая характеристика пациентов с ХСН, вызванной артериальной гипертензией, ИБС и факторами кардиометаболического риска

Показатели	Пациенты с ХСН (n = 334)
Возраст, лет	55,75 ± 14,97
Пол	41% женщины, 59% мужчины
ХСН с сохранной фракцией выброса, ФВ ЛЖ ≥ 50%	205 (61%)
ХСН с промежуточной ФВ ЛЖ (40% < ФВ < 50%)	97 (29%)
ХСН со сниженной фракцией выброса, ФВ < 40%	32 (10%)
МЖП, мм	12,39 ± 1,27
ЗСЛЖ, мм	11,75 ± 1,63
ИММ ЛЖ, г/м <sup>2</sup>	145,62 ± 43,00
КДР, мм	51,8 ± 9,6
Увеличенное ЛП	273 (82%)
ЛП, мм	47,8 ± 9,3
Индекс ЛП, мм/м <sup>2</sup>	25,2 ± 4,9
Фракция выброса (Simpson), %	51,9 ± 13,9%
Ожирение	129 (39%)
Сахарный диабет	80 (24%)
НТГ	20 (6%)

Возраст пациентов на момент обследования и постановки диагноза ХСН в среднем составлял  $55,75 \pm 14,97$  лет. Большинство пациентов имели ХСН с сохранной фракцией выброса.

Нами было оценено распределение аллелей и генотипов rs2270915 гена *NPR3*, rs2069542 и rs45554236 гена *MYH7*, rs942077 и rs35141404 гена *RBM20*, rs7124958, rs2290149, rs753992 и rs10838692 гена *MADD* (Таблица 32). Данные полиморфные варианты были выбраны на основе анализа литературных данных о их связи с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного фенотипа.

Таблица 32 — Распределение аллелей и генотипов в исследуемой и контрольной группах, а также в европейской популяции по данным базы данных ExAc

Полиморфный вариант	Ген	Распределение генотипов в группе исследования	Распределение генотипов в группе контроля	Распределение генотипов по данным dbSNP
rs2270915	NPR3	AA — 66% (209) AG — 31% (101) GG — 3% (12) A — 81,5% G — 18,5%	AA — 69% (264) AG — 26% (100) GG — 5% (20) A — 82% G — 18%	AA — 80% AG — 12% GG — 8% A — 86% G — 14%
rs2069542	MYH7	AA — 0,6% (2) AG — 29% (95) GG — 70,4% (232) A — 15,1% G — 84,9%	AA — 0,5% (2) AG — 27% (104) GG — 72,5% (278) A — 14% G — 86%	AA — 3% AG — 29% GG — 68% A — 17% G — 83%
rs45554236	MYH7	CC — 99,7% (325) CT — 0,3% (1) TT — 0% (0) C — 99,85% T — 0,15%	CC — 99,5% (382) CT — 0,5% (2) TT — 0% (0) C — 99,75% T — 0,25%	CC — 99,6% CT — 0,4% TT — 0% C — 99,8% T — 0,2%
rs753992	MYBPC3	AA — 2,5% (8) AG — 25,5% (83) GG — 72% (237) A — 15,25% G — 84,75%	AA — 2% (8) AG — 27% (104) GG — 71% (272) A — 15,5% G — 84,5%	AA — 2% AG — 27% GG — 70% A — 15% G — 84%
rs942077	RBM20	CC — 78% (256) CG — 20% (65) GG — 2% (7) C — 88% G — 12%	CC — 79% (304) CG — 19% (72) GG — 2% (8) C — 88,5% G — 11,5%	CC — 79% CG — 17% GG — 4% C — 87% G — 13%
rs35141404	RBM20	AA — 2% (7) AG — 26% (84)	AA — 0,8% (3) AG — 18,8% (72)	AA — 1% AG — 22%

Полиморфный вариант	Ген	Распределение генотипов в группе исследования	Распределение генотипов в группе контроля	Распределение генотипов по данным dbSNP
		GG — 72% (235) A — 15% G — 85%	GG — 80,4% (309) A — 10,2% G — 89,8%	GG — 77% A — 14% G — 86%
rs7124958	MADD	CC — 70% (228) CT — 27% (87) TT — 3% (11) C — 83,5% T — 16,5%	CC — 70% (269) CT — 26% (101) TT — 4% (14) C — 83% T — 17%	CC — 80% CT — 20% TT — 0% C — 90% T — 10%
rs2290149	MADD	CC — 3% (10) CT — 16% (53) TT — 81% (263) C — 11% T — 89%	CC — 7% (27) CT — 21% (82) TT — 72% (275) C — 17,5% T — 82,5%	CC — 3% CT — 22% TT — 75% C — 14% T — 86%
rs10838692	MADD	CC — 10% (33) CT — 39% (128) TT — 51% (167) C — 29,5% T — 70,5%	CC — 19% (72) CT — 38% (146) TT — 43% (166) C — 38% T — 62%	CC — 10% CT — 42% TT — 48% C — 31% T — 69%

Поскольку rs45554236 был представлен в исследуемой и контрольной популяции в основном одним генотипом и, таким образом, представлял собой редкий полиморфный вариант с частотой минорного аллеля менее 1%, в дальнейшем он был исключен из анализа. Для всех остальных исследуемых полиморфных вариантов (rs2270915, rs2069542, rs753992, rs942077, rs35141404, rs7124958, rs2290149, rs10838692) были исследованы ассоциации аллелей и генотипов с наличием в исследуемой группе диастолической сердечной недостаточности, рестриктивного типа наполнения левого желудочка, наличием гипертрофии миокарда и концентрическим и эксцентрическим ее вариантом, а также наличием дилатации левого предсердия. Для сравнения частот аллелей и генотипов использовался Критерий Хи-квадрат и точный критерий Фишера.

Нами были получены достоверные различия в частоте распределения аллелей и генотипов rs942077 и rs3514140 гена *RBM20*, а также rs2290149 и rs10838692 гена *MADD* в зависимости от ряда клинических и функциональных параметров.

Было выявлено различие в распределении вариантов генотипа rs942077 гена *RBM20* среди пациентов с сохранной и сниженной фракцией выброса и преобладание генотипа GG среди пациентов с ХСН со сниженной фракцией выброса (Таблица 33). Таким образом, генотип GG rs942077 ассоциирован с развитием систолической дисфункции у пациентов с ХСН. Связи генотипов и аллелей данного генетического варианта с развитием гипертрофии миокарда и рестриктивного типа трансмитрального кровотока выявлено не было.

Таблица 33 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs942077 гена *RBM20* в группе пациентов с ХСН и в контрольной группе

Генотипы и аллели	Группа со сниженной ФВ, % (n)	Группа с сохранной ФВ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
CC	76,1% (93)	79,5% (159)	78,3% (252)	79,2% (304)
CG	18,9% (23)	20% (40)	19,7% (63)	18,8% (72)
GG	5% (6)	0,5% (1)	2% (7)	2% (8)
p = 0,00000476				
C	79% (209)	89,5% (358)	88% (567)	88,5% (680)
G	21% (35)	10,5% (42)	12% (77)	11,5% (88)
CC+CG	95% (116)	99,5% (199)	98% (315)	98% (376)
GG	5% (6)	0,5% (1)	2% (7)	2% (8)
p = 0,013				

Для rs35141404 гена *RBM20* было выявлено различие в распределении генотипов между группой пациентов с дилатацией левого предсердия (ЛП) и группой контроля (Таблица 34). Генотип GG в группе с дилатацией левого предсердия встречался достоверно реже по сравнению с контрольной группой.

Таблица 34 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs35141404 гена *RBM20* в группе пациентов с ХСН и в контрольной группе

Генотипы и аллели	Группа без дилатации ЛП, % (n)	Группа с дилатацией ЛП, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
AA	3,3% (2)	1,8% (5)	2,1% (7)	0,8% (3)
AG	21,3% (13)	26,9% (73)	25,9% (86)	18,8% (72)
GG	75,4% (46)	71,3% (193)	72% (239)	80,5% (309)
p = 0,000658				
A	14% (17)	15% (83)	15% (100)	10% (78)
G	86% (105)	85% (459)	85% (564)	90% (690)
AA+AG	24,6% (15)	28,8% (78)	28% (93)	19,5% (75)
GG	75,4% (46)	71,2% (193)	72% (239)	80,5% (309)
p = 0,0066				

Для генетического варианта rs2290149 гена *MADD* были обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов между контрольной группой и исследуемыми группами пациентов без рестриктивного типа наполнения левого желудочка и пациентов с гипертрофией левого желудочка как эксцентрической, так и не эксцентрической, а также между контрольной группой и группами пациентов с диастолической сердечной недостаточностью и пациентов с дилатацией левого предсердия.

В частности, для rs2290149 была выявлена разница в распределении генотипов между контрольной и исследуемой группой, а также группой пациентов с нерестриктивным типом наполнения левого желудочка и установлена более высокая встречаемость генотипа ТТ в перечисленных группах по сравнению с группой контроля (Таблица 35). Аллель Т в исследуемой группе пациентов и подгруппе без рестриктивного типа кровенаполнения также встречался достоверно чаще. Также наблюдалось различие в распределении аллелей и генотипов данного полиморфного варианта между пациентами с ХСН и сохранной ФВ и контрольной группой. Была выявлена более частая встречаемость аллеля Т и генотипа ТТ среди пациентов с ХСН с сохранной ФВ по сравнению с контрольной группой.

Таблица 35 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от наличия рестриктивного фенотипа и в контрольной группе

Генотипы и аллели	Группа без рестриктивного фенотипа, % (n)	Группа с рестриктивным фенотипом, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	2,7% (7)	4,5% (3)	3,1% (10)	7% (27)
СТ	15,8% (41)	18,2% (12)	16,3% (53)	21,4% (82)
ТТ	81,5% (212)	77,3% (51)	80,6% (263)	71,6% (275)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,00007</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,00002</p>				
С	10,6% (55)	13,6% (18)	11% (73)	18% (136)
Т	89,4% (465)	86,4% (114)	89% (579)	82% (632)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,00007</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,0008</p>				
СТ+СС	18,5% (48)	22,7% (15)	19,4% (63)	28,4% (109)
ТТ	81,5% (212)	77,3% (51)	80,6% (263)	71,6% (275)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,005</p> <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> <p style="text-align: center;">p = 0,0049</p>				

Распределение аллелей и генотипов rs2290149 отличалось между пациентами с ГЛЖ и пациентами контрольной группы (Таблица 36). Выявлена более частая встречаемость генотипа ТТ и аллеля Т среди пациентов с ГЛЖ по сравнению с пациентами контрольной группы. При анализе типа гипертрофии, ассоциированной с генотипом ТТ и аллелем Т, выявлено, что группы с эксцентрическим и не эксцентрическим типом гипертрофии по распределению генотипов и аллелей между собой достоверно не различаются, для обоих типов гипертрофии, равно как и для всей исследуемой группы, получены достоверные отличия в распределении частот генотипов по сравнению с контрольной группой (Таблица 37).

Таблица 36 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от наличия ГЛЖ

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

Таблица 37 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от типа ГЛЖ

Генотипы и аллели	Не эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	2,5% (6)	3,5% (3)	2,8% (9)	7% (27)
СТ	18,2% (43)	10,6% (9)	16,1% (52)	21,4% (82)
ТТ	79,3% (188)	85,9% (73)	81,1% (261)	71,6% (275)
$p = 0,0000049$				
$p = 0,00034$				
$p = 0,00016$				
С	12% (55)	9% (15)	11% (70)	18% (136)
Т	88% (419)	91% (155)	89% (574)	82% (632)

Генотипы и аллели	Не эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Эксцентрический тип ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
			$p = 0,00028$	
			$p = 0,0043$	
			$p = 0,0038$	
СС+СТ	20,7% (49)	14,1% (12)	18,9% (61)	28,4% (109)
ТТ	79,3% (188)	85,9% (73)	81,1% (261)	71,6% (275)
			$p = 0,0034$	
			$p = 0,0065$	

Нами была выявлена большая встречаемость генотипа ТТ как среди пациентов с концентрическим типом гипертрофии, так и среди пациентов с эксцентрическим типом гипертрофии по сравнению с группой контроля. Аллель Т также преобладал среди пациентов с эксцентрическим типом гипертрофии. В дополнение нами были проанализированы частоты распределения аллелей и генотипов rs2290149 среди пациентов с ХСН в зависимости от наличия или отсутствия дилатации ЛП (Таблица 38). Распределение частот генотипов у пациентов с дилатацией ЛП отличалось от распределения в контрольной группе с преобладанием аллеля Т и генотипа ТТ в группе пациентов с дилатацией ЛП.



Таблица 38 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs2290149 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН и дилатацией ЛП

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

Таким образом, нами выявлена большая встречаемость аллеля Т и генотипа ТТ среди пациентов с концентрическим и эксцентрическим типом ГЛЖ, пациентов с ХСН с сохранной фракцией выброса, пациентов ХСН без рестриктивного типа наполнения левого желудочка, а также пациентов с дилатацией ЛП.

Для генетического варианта rs10838692 гена *MADD* были обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов между контрольной и исследуемой группами, контрольной группой и группой ХСН с сохранной ФВ, пациентами с рестриктивным и нерестриктивным типом наполнения левого желудочка, группой с гипертрофией левого желудочка, преимущественно концентрическим ее типом, а также группой пациентов с дилатацией левого предсердия.

В частности, для rs10838692 наблюдалось различие в распределении аллелей и генотипов данного полиморфного варианта между пациентами с ХСН с сохранной ФВ и контрольной группой, а также между пациентами с ХСН с

сохранной и сниженной ФВ (Таблица 39). Аллель Т достоверно чаще встречался в группе пациентов с диастолической ХСН, а генотип СС встречался в данной группе пациентов достоверно реже по сравнению с группой ХСН со сниженной ФВ и контрольной группой.

Таблица 39 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от типа ХСН

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

Различия в распределении аллелей и генотипов данного генетического варианта также наблюдались между пациентами с рестриктивным типом диастолической дисфункции и без рестриктивного типа (Таблица 40). Так, аллель Т встречался чаще среди пациентов без рестриктивного типа кровотока, а также в исследуемой группе в целом. В то же время генотип СС реже встречался среди пациентов с рестриктивным типом кровотока и за счет этого в исследуемой группе в целом. Низкое значение критерия значимости при сравнении группы с

рестриктивным типом кровотока и контрольной группы, вероятно, обусловлено малым размером данной группы и разной величиной сравниваемых групп при использовании точного критерия Фишера.

Таблица 40 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от наличия рестриктивного фенотипа

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

Для полиморфного варианта rs10838692 нами также были получены достоверные различия в частоте распределения аллелей и генотипов между пациентами с ГЛЖ и контрольной группой (Таблица 41). Аллель Т достоверно чаще встречался как в группе с ГЛЖ, так за счет этого и во всей исследуемой группе по сравнению с группой контроля. При этом обнаружена более редкая встречаемость генотипа СС в группе с ГЛЖ по сравнению с группой контроля.

Таблица 41 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от наличия ГЛЖ

Генотипы и аллели	Группа без ГЛЖ, % (n)	Группа с ГЛЖ, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	12% (6)	9,6% (27)	10% (33)	18,8% (72)
СТ	44% (22)	38,3% (107)	39,1% (129)	38% (146)
ТТ	44% (22)	52,1% (146)	50,9% (168)	43,2% (166)
$p < 10^{-10}$				
$p < 10^{-9}$				
С	34% (34)	29% (161)	30% (195)	38% (290)
Т	66% (66)	71% (399)	70% (465)	62% (478)
$p = 0,0012$				
$p = 0,0007$				
ТТ+СТ	88 (44)	90,4% (253)	90% (297)	81,2% (312)
СС	12% (6)	9,6% (27)	10% (33)	18,8% (72)
$p = 0,001$				
$p = 0,0013$				

При анализе подгрупп пациентов с различным типом гипертрофии — концентрической или эксцентрической, выявлена разная встречаемость аллелей и генотипов в группе с концентрической ГЛЖ по сравнению с контрольной группой (Таблица 42). Так, наблюдалась большая встречаемость аллеля Т в группе с концентрическим типом ГЛЖ и в общей исследуемой группе по сравнению с контрольной группой. Также выявлено снижение частоты генотипа СС в группе с концентрическим типом ГЛЖ и в общей исследуемой группе по сравнению с группой контроля.

Таблица 42 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от типа ГЛЖ

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

В дополнение нами проведен анализ распределения частот аллелей и генотипов rs10838692 в подгруппах пациентов в зависимости от наличия дилатации ЛП (Таблица 43). Нами выявлено различие в распределении генотипов между группой пациентов с дилатацией ЛП и контрольной группой. Так, наблюдалась большая частота встречаемости аллеля Т в группе с дилатацией ЛП и в общей исследуемой группе по сравнению с контрольной группой. Также в группе с дилатацией ЛП выявлено снижение встречаемости генотипа СС среди пациентов с дилатацией ЛП и в общей исследуемой группе по сравнению с группой контроля.

Таблица 43 — Распределение генотипов и аллелей полиморфного варианта rs10838692 гена *MADD* в группе пациентов с ХСН в зависимости от наличия дилатации ЛП

Генотипы и аллели	Группа без дилатации ЛП, % (n)	Группа с дилатацией ЛП, % (n)	Все пациенты, % (n)	Контрольная группа, % (n)
СС	14,8% (9)	8,8% (24)	9,9% (33)	18,8% (72)
СТ	39,3% (24)	39,6% (108)	39,5% (132)	38% (146)
ТТ	45,9% (28)	51,6% (141)	50,6% (169)	43,2% (166)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p < 10^{-10}$ <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p < 10^{-13}$				
С	34% (42)	29% (156)	30% (198)	38% (290)
Т	66% (80)	71% (350)	70% (470)	62% (478)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p = 0,0012$ <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p = 0,01$				
ТТ+СТ	85,2% (52)	91,2% (249)	90,1% (301)	81,2% (312)
СС	14,8% (9)	8,8% (24)	9,9% (33)	18,8% (72)
<hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p = 0,001$ <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $p = 0,0001$				

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

Для rs10838692 выявлены значимые ассоциации с развитием концентрического варианта ГЛЖ и рестриктивного фенотипа, а также с наличием ХСН с сохранной фракцией выброса и дилатацией ЛП. Нами показано, что

встречаемость генотипов rs10838692 различается в группе с ХСН и рестриктивным типом кровотока и в группе больных с ХСН без рестриктивного кровотока. Выявлена более низкая встречаемость генотипа СС в группе пациентов с рестриктивным типом кровотока по сравнению с группой контроля, а также в группе с ХСН с сохранной фракцией выброса по сравнению с группой ХСН со сниженной ФВ. Частота встречаемости генотипа СС также ниже в группе пациентов с ХСН и ГЛЖ, в частности, в группе пациентов с концентрическим типом ГЛЖ. Полученные ассоциации для полиморфных вариантов rs2290149 и rs10838692 гена *MADD* позволяют говорить о значимости данных генетических вариантов для развития гипертрофии миокарда, в частности концентрического ее типа, диастолической сердечной недостаточности и рестриктивного типа кровотока в ЛЖ. Нами показано преобладание частоты аллеля Т и генотипа ТТ rs2290149 в группе пациентов с ХСН и ГЛЖ и группе пациентов с ХСН и сохранной ФВ, а также снижение частоты аллеля С и генотипа СС rs10838692 в группе пациентов с ХСН и ГЛЖ, концентрическим вариантом ремоделирования миокарда, рестриктивным типом кровотока и ХСН с сохранной ФВ.

Для полиморфных вариантов rs942077 и rs3514140 гена *RBM20* значимых ассоциаций с развитием ГЛЖ, диастолической дисфункцией и рестриктивным кровотоком обнаружено не было.

## Глава 10. ОБСУЖДЕНИЕ

### 10.1. Особенности клинического течения и информативность шкал расчета риска ХСН при идиопатической РКМП в различных возрастных группах

В данной работе мы выявили ряд отличительных клинических характеристик в течении и прогнозе заболевания у пациентов с РКМП различных возрастных групп. В целом полученные нами данные подтверждают неблагоприятный прогноз и высокий риск развития терминальной ХСН в данной группе пациентов, что неоднократно было продемонстрировано ранее другими авторами. Отличительной чертой нашего исследования является сравнение клинического течения заболевания в группе пациентов с дебютом заболевания в детском и взрослом возрасте.

Особенности неблагоприятного течения РКМП в детском возрасте, особенно на фоне болезней накопления и синдромальных форм РАСопатий, неоднократно подчеркивалось в предыдущих исследованиях [368, 397, 424]. Однако особенностью представленной в данном исследовании группы является отсутствие в ней пациентов с заболеваниями обмена и врожденными синдромами по типу РАСопатий. В то же время именно для этой группы пациентов нами был показан наиболее неблагоприятный прогноз, особенно при дебюте заболевания до 5 лет. Вопреки распространенному мнению о превалировании в данной группе пациентов с РКМП мультисистемных нарушений обмена и болезней накопления, исследованная нами группа пациентов в качестве генетической причины заболевания имела в основном типичные для генетического спектра кардиомиопатий гены саркомерных и цитоскелетных белков, а также их сочетание, что согласуется с опубликованными недавно данными американских исследователей [429]. В представленной ими работе менее 30% случаев РКМП у детей имели системные проявления, в большинстве из которых причиной заболевания была серповидно-клеточная анемия. Несмотря на отсутствие синдромальных форм РКМП, мы впервые показали неблагоприятный прогноз для



детской группы пациентов, а также продемонстрировали высокую частоту фенотипической трансформации и сочетания с другими внутрисемейными формами КМП и ВПС среди пациентов детского возраста [10]. Данное наблюдение ранее описывалось несколькими группами исследователей [1, 11, 23, 33, 48]. Сходные данные были получены S. Maskatia и соавторами при исследовании пациентов детского возраста с ГКМП и рестриктивным фенотипом, в исследовании было показано значимое снижение показателей выживаемости в группе с признаками рестриктивного трансмитрального кровотока по данным ЭхоКГ [269]. Авторы показали, что рестриктивный тип трансмитрального кровотока у детей с ГКМП увеличивает вероятность ВС в 3,8 раз и вероятность ТС в 5,7 раз.

Основным фактором неблагоприятного прогноза в общей группе пациентов с РКМП, исследованной нами, явилось наличие постоянной формы ФП. Данное осложнение наблюдалось в основном среди взрослых пациентов и являлось редким наблюдением у детей. Отличительной особенностью течения заболевания в детской группе было частое развитие синдрома ВС, в то время как среди пациентов взрослой группы наиболее часто причиной смерти/трансплантации являлась прогрессирующая СН. В настоящее время существует лишь ряд нозологий, для которых определены особые показания для имплантации ИКД, среди которых ГКМП и АКМП [3, 4, 105, 299]. Учитывая высокую частоту развития синдрома ВС среди пациентов с РКМП, особенно в детской возрастной группе и на фоне причинных вариантов в генах саркомерных белков, актуальным является разработка специальных критериев имплантации ИКД в данной группе пациентов [22]. Различные клинические варианты течения ХСН и РКМП у пациентов детского и взрослого возраста диктуют необходимость дифференцированного подхода к определению прогноза для таких пациентов, в связи с чем нами была предпринята попытка применения шкал расчета риска смерти при ХСН на группе взрослых пациентов.

В данной работе мы тестировали возможность использования шкал расчета прогноза риска смерти от ХСН в группе пациентов с идиопатическими формами РКМП. В группу расчета риска вошли только пациенты взрослого возраста,

поскольку все известные шкалы валидизированы только для популяции пациентов старше 18 лет и не дают возможности их использования у пациентов более молодого возраста. В то же время для части пациентов обследованной группы не были доступны такие параметры, как NT-proBNP в течение всего времени наблюдения и данные КРТ. В связи с этим в исследуемой нами группе пациентов мы не могли апробировать шкалы HFSS и МЕСКИ, основанные на использовании параметров КРТ, и проведенный анализ включил сравнение следующих четырех шкал — SHFM, MAGGIC, ЗС-НФ и MUSIC.

Все тестируемые шкалы показали свою информативность в отношении пациентов с ХСН, обусловленной идиопатической РКМП. Во всех случаях при определении одногодичного прогноза отмечалось значимое различие между пациентами, достигшими конечной точки в течение года и пациентами, не достигшими конечной точки. Небольшое количество включенных в анализ пациентов (20) не позволяет использовать полученные данные для выработки рекомендаций относительно пороговых значений по всем из приведенных шкал и достоверно обозначить уровень, определяющий необходимость включения пациента в лист ожидания ТС. Однако продемонстрированная нами потенциальная возможность их использования диктует необходимость дальнейших исследований с увеличением размера группы и выделением наиболее значимых факторов неблагоприятного прогноза.

Первая из тестируемых шкал — шкала SHFM — была разработана для пациентов с СН-нФВ и по формальным критериям не может являться оптимальной для группы пациентов с РКМП. Однако данная шкала риска является одной из наиболее распространенных и широко применяемых для определения показаний к включению пациентов в лист ожидания ТС. В доступной нам литературе не встречалось данных о применении данной шкалы в группе пациентов с СН-сФВ. Несмотря на то что в исследуемой нами группе половина пациентов имела СН-сФВ, полученные нами данные продемонстрировали информативность данной шкалы в отношении пациентов с ХСН, обусловленной идиопатической РКМП. В отличие от SHFM, шкала MAGGIC была разработана и валидизирована на группах

пациентов как с СН-нФВ, так и СН-сФВ. В связи с этим она потенциально может использоваться у всех пациентов с ХСН на фоне РКМП. ROC-анализ использования двух шкал (SHFM и MAGGIC) показал их сходную информативность и отсутствие достоверного отличия по параметру «площади под ROC-кривой». Однако, основываясь на данном показателе, диагностически более точной следует признать шкалу риска MAGGIC по сравнению с SHFM ( $AUC = 0,947$  для шкалы MAGGIC и  $AUC = 0,920$  для шкалы SHFM). Данный факт может объясняться тем, что шкала SHFM была разработана для группы пациентов с СН-нФВ и не предназначена для пациентов с СН-сФВ. Сходные данные получены при анализе распределения при расчете по обеим шкалам (Рисунок 10). Данный анализ иллюстрирует распределение всех событий между двумя шкалами риска и позволяет выделить пациентов, определяющих снижение специфичности двух исследуемых шкал. В обоих случаях такими пациентами являлись пациенты 3 и 5, у которых конечная точка была представлена ВСС вне связи с явлениями прогрессирования ХСН. Несмотря на то что малое количество пациентов, включенных в исследование, не позволяет сделать вывод, основанный на статистическом анализе, возможно предположить, что шкалы расчета риска SHFM и MAGGIC у пациентов с РКМП более информативны и специфичны в отношении конечных точек, ассоциированных с прогрессирующим ХСН, и будут в меньшей степени информативны в отношении конечных точек, связанных с аритмическими и эмболическими событиями. Данное наблюдение может объясняться и тем фактом, что шкалы SHFM и MAGGIC были разработаны в основном на когортах пациентов с ХСН ишемического генеза для определения показаний и оптимальных сроков проведения ТС. Развитие и прогрессирующее жизнеопасных нарушений ритма у пациентов данной группы ассоциировано с течением основного заболевания, а также развитием атеросклеротического или постинфарктного кардиосклероза. В то же время у пациентов с некоронарогенной патологией жизнеопасные нарушения ритма могут являться первыми симптомами заболевания и быть обусловлены первичной электрической нестабильностью миокарда, проявлением мелкоочагового фиброза и феномена дисконфлексии вне связи с

симптомами и прогрессированием клиники ХСН. Важно отметить также, что в обоих перечисленных случаях пациенты с низким риском достижения конечной точки по шкалам SHFM и MAGGIC имели в качестве причины развития РКМП мутации в генах саркомерных белков, сходные по молекулярному механизму патогенного действия с таковыми при ГКМП. Известно, что при ГКМП, особенно в генотип-позитивных случаях, ассоциированных с мутациями в генах саркомерных белков, прогноз для пациентов хуже по сравнению с генотип-негативными случаями и определяется в основном риском ВС, рассчитываемым по калькулятору риска [300]. Данный факт может служить дополнительным объяснением развития синдрома ВСС и достижения конечной точки пациентами с низким риском по шкалам SHFM и MAGGIC вне связи с проявлениями ХСН, поскольку в обеих перечисленных шкалах не учитывается фактор нарушений ритма у пациента.

В нашей работе было показано, что одним из факторов, наиболее сильно влияющих на выживаемость пациентов с РКМП, является наличие постоянной формы ФП. Тем не менее данный фактор не учитывается ни в одной из перечисленных выше шкал риска ХСН. В связи с этим нами был проведен дополнительный анализ риска неблагоприятного исхода у пациентов с РКМП с применением двух шкал, учитывающих фактор наличия ФП — шкалы 3С-НФ и шкалы MUSIC. В обеих из этих шкал в качестве дополнительного фактора риска рассматривалась низкая фракция выброса левого желудочка ( $\leq 20\%$  в аддитивной шкале 3С-НФ и  $\leq 35\%$  в шкале MUSIC). В дополнение в шкале MUSIC учитывается фактор дилатации левого предсердия, выраженный в виде индекса объема ЛП более  $26 \text{ мм/м}^2$ . Именно данные две шкалы оказались наиболее информативными в отношении разделения пациентов с РКМП с благоприятным и неблагоприятным одногодичным прогнозом с достижением 100% специфичности при применении шкалы 3С-НФ. Меньшая информативность шкалы MUSIC в данном случае может объясняться тем, что ее дизайн является аддитивным с расчетом общего интегрального балла, условно соответствующего высокому или низкому риску, в то время как большинство других шкал имеют в основе логистическую модель расчета с определением вероятности достижения конечной точки, выраженной в

процентах. Важно также отметить, что при использовании шкалы MUSIC все три ее модификации (определение общего риска неблагоприятного исхода, определение риска достижения конечной точки вследствие сердечно-сосудистых причин, определение риска достижения конечной точки вследствие систолической дисфункции) в приложении к группе пациентов с РКМП были информативными. Исключение для данной шкалы составила только ее модификация с расчетом риска развития внезапной смерти. Данный факт может являться дополнительным подтверждением того, что на сегодняшний день не существует информативной шкалы риска ВС для группы пациентов с РКМП, и данная причина достижения конечной точки не может быть достоверно учтена при применении всех вышеперечисленных шкал. Суммируя результаты, полученные при изучении всех вышеперечисленных шкал оценки прогноза, можно сделать вывод о ведущей роли таких факторов, как функциональный класс ХСН, ФВ ЛЖ и наличие ФП в определении прогноза и риска смерти пациентов с РКМП от ХСН.

Набор факторов, учитываемых в шкалах SHFM, MAGGIC и 3С-HF, позволил провести в исследуемой нами группе сравнение расчетных параметров риска для ряда пациентов за 1 и за 3 года до развития конечной точки. Данное сравнение выявило нарастание риска в динамике, иллюстрируя чувствительность данных шкал в приложении к группе пациентов с РКМП. Данное наблюдение также позволяет исключить вероятность того, что пациенты с РКМП высокого риска являются таковыми изначально по причине неизменяемых параметров (пол, возраст), а не приобретают дополнительный риск по мере усугубления заболевания и расширения набора учитываемых в шкале факторов риска. Значимое возрастание в динамике за 3 года риска достижения конечной точки у пациентов с РКМП отражает чувствительность применяемых шкал и их прямую взаимосвязь с факторами, определяющими прогноз у пациентов с РКМП.

Ранее в исследовании J. Frankle было показано, что ФП ассоциирована с неблагоприятным прогнозом у пациентов с ХСН исключительно ишемического генеза, и не имеет предиктивной ценности в группе пациентов с ХСН, обусловленной ДКМП [132]. В то же время среди пациентов с ГКМП ФП, равно

как и увеличенные размеры ЛП, неоднократно были ассоциированы с неблагоприятным исходом [45, 142, 159, 193, 249, 347]. В той же группе пациентов показана и ассоциация рестриктивного фенотипа с неблагоприятным прогнозом [269, 298, 303]. Таким образом, тестирование различных шкал расчета риска ХСН у пациентов с РКМП показало, что наиболее значимыми факторами, позволяющими выделить группу с неблагоприятным прогнозом, связанным с ХСН, являются функциональный класс, фракция выброса ЛЖ, а также размеры левого предсердия и наличие постоянной формы ФП.

В данном фрагменте работы нами впервые был проведен анализ потенциальной возможности применения шкал расчета риска и прогноза ХСН на группе пациентов с РКМП. Отсутствие возможности проведения данного анализа в группе детей и отсутствие данных КРТ для большей части пациентов сделали возможным проведение данного анализа на небольшой группе из 20 пациентов, что является существенным ограничением исследования. Несмотря на это, нами были получены предварительные данные об информативности, специфичности и чувствительности данных шкал в группе пациентов с РКМП и ХСН. Нами было показано, что даже шкала SHFM, разработанная исключительно для пациентов с систолической дисфункцией, может быть информативна в группе взрослых пациентов с РКМП. Наибольшей чувствительностью и специфичностью в отношении исследуемой группы пациентов обладали шкалы 3С-HF и MUSIC, учитывающие фактор наличия ФП и параметры ЛП. Данное наблюдение, в сочетании с вкладом ФП в кривую выживаемости пациентов с РКМП, диктует необходимость проведения дальнейших исследований на большей группе пациентов и углубленного анализа вклада ФП в прогноз для пациентов с РКМП различных возрастных групп.

## **10.2. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии**

В проведенном исследовании мы определили генетический спектр РКМП с применением метода массового параллельного секвенирования. Выявленный нами

спектр мутаций подчеркивает ключевую роль в развитии РКМП белков цитоскелета, белков области Z-дисков и белков, участвующих в процессе механотрансдукции [20]. В большинстве предшествующих публикаций в качестве основных генетических причин развития РКМП обсуждались мутации в генах саркомерных белков, таких как *MYH7*, *ACTC1*, *TNNI3* и *TNNT2* [281]. В упомянутых работах РКМП представлялась в качестве осложненного варианта развития ГКМП вследствие наиболее выраженного эффекта мутаций в отношении чувствительности миофиламентов к концентрации ионов  $Ca^{2+}$  и влияния на активность актинмиозиновой АТФ-азы [108, 150]. В нашем исследовании мы подтвердили роль саркомерных белков в развитии РКМП, но, кроме этого, существенно расширили спектр ассоциированных с РКМП генов и продемонстрировали преобладающую роль цитоскелетных белков в патогенезе данной формы кардиомиопатии.

С развитием технологии секвенирования нового поколения и обнаружением большого количества новых, ранее не описанных генетических вариантов, определение их как патогенных или вероятно-патогенных является сложной задачей [15]. Несмотря на рост числа новых генетических вариантов, идентифицированных методом экзомного и целевого параллельного секвенирования, многие из них по-прежнему имеют статус «варианта неопределенной значимости» до тех пор, пока не будут получены дополнительные доказательства их патогенной роли путем проведения функциональных исследований или в связи с описанием новых клинических случаев [31]. Многие из таких вариантов трансформируют свой статус из «варианта неопределенной значимости» в «патогенный» или «вероятно-патогенный» с увеличением числа зарегистрированных в международных базах данных случаев и в связи с публикацией новых данных функциональных исследований [49]. В нашей работе большинство выявленных патогенных или вероятно-патогенных вариантов были определены в генах, кодирующих саркомерные белки. Отчасти это может быть обусловлено тем фактом, что большая часть этих вариантов была описана в связи с ГКМП, генетическая природа которой изучена гораздо лучше вследствие более

высокой частоты заболевания и четко очерченного спектра причинных генов [16-18, 270]. В нашей работе в анализ бали включены все выявленные варианты, разделенные на патогенные, вероятно-патогенные и варианты неопределенной значимости независимо от их функционального эффекта, предсказанного методами предиктивного анализа, и их наличия в международных базах данных.

Поскольку около половины выявленных нами случаев с положительным результатом генотипирования были связаны с множественными патогенными, вероятно-патогенными вариантами или вариантами неопределенной значимости, нами был сделан вывод о том, что РКМП часто является следствием сочетания нескольких вариантов, а не результатом одной мутации или одного генетического варианта. Мы предположили, что именно индивидуальное сочетание патогенных, вероятно-патогенных вариантов, вариантов неопределенной значимости, а также редких однонуклеотидных полиморфизмов лежит в основе внутрисемейной фенотипической вариабельности РКМП и обуславливает тенденцию к фенотипической трансформации заболевания.

Обнаруженные патогенные и вероятно-патогенные варианты наиболее часто обнаруживаются в группе генов саркомерных белков, часто в сочетании с вариантами неопределенной значимости в генах, кодирующих цитоскелетные белки и белки области Z-дисков. С учетом ключевой роли цитоскелета и белков области Z-дисков в передаче силы сокращения, наши данные подчеркивают важность процесса механочувствительности и механотрансдукции в развитии рестриктивного типа ремоделирования миокарда. В связи с этим нами была высказана гипотеза о том, что при РКМП мутации в генах, кодирующих сократительные саркомерные белки, вызывают компенсаторный гипертрофический ответ, как и в случае ГКМП, который, в свою очередь, не может быть полностью реализован из-за сопутствующего дефекта белков, обеспечивающих процесс механотрансдукции, что и приводит к развитию рестриктивного типа ремоделирования левого желудочка. Эта гипотеза подкрепляется биоинформатическим моделированием основных сигнальных



путей, вовлеченных в развитие РКМП, что также подчеркивает ключевую роль процессов механочувствительности и механотрансдукции в развитии РКМП.

В нашем исследовании мы расширили спектр мутаций в *MYBPC3* и продемонстрировали связь данного гена с развитием РКМП. В то же время мутации в данном гене многократно описаны в качестве причинных при ГКМП и ДКМП [341]. Данный факт еще более значимо отражает генетическую и патофизиологическую связь между ГКМП и РКМП [108, 150]. В группе пациентов с РКМП нами выявлено несколько новых вариантов в генах, кодирующих ионные каналы и десмосомные белки (*CACNA1C*, *CACNB2*, *ANK2*). В настоящее время нет данных, позволяющих убедительно судить о том, что эти варианты могут повлиять на процесс диастолического расслабления миокарда. В этом контексте заслуживает внимания тот факт, что исследования с использованием кардиомиоцитов, полученных в результате направленной кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток от пациентов с синдромом удлиненного интервала QT, выявили изменения в сократимости и длительности релаксации изолированных клеток [207]. Интересно отметить, что в недавнем исследовании большой когорты пациентов с некомпактным миокардом также было продемонстрировано, что в значительной части случаев в основе генетической природы этой формы кардиомиопатии лежат патогенные варианты в генах, кодирующих ионные каналы — *HCN4*, *KCNQ1*, *RYR2*, *SCN5A* [40, 407]. Детальные механизмы этого феномена и роль генов ионных каналов в процессе развития РКМП и других структурных вариантов кардиомиопатий требуют дальнейшего уточнения и углубленных исследований [35].

Важным результатом проведенного исследования явился вывод о том, что РКМП, ассоциированная с мутациями (патогенными и вероятно-патогенными вариантами) в саркомерных генах имеет худший вариант клинического течения по сравнению с группой мутаций в несаркомерных генах. Данное наблюдение справедливо как для группы пациентов детского возраста, так и для взрослых пациентов и согласуется с работами нескольких авторов в области изучения ГКМП и НЛЖ, которые также продемонстрировали худший прогноз у пациентов с

редкими и причинными вариантами в саркомерных генах по сравнению с «генотип-отрицательными» пациентами [256, 257, 407].

В двух случаях в основе развития РКМП нами идентифицированы вероятно-патогенные варианты в гомозиготном состоянии (пациенты 33 и 35). В первом случае описанная точечная замена в гене *MYL2* не является редким полиморфизмом и не описана как вариант, существующий в популяции ни в одной из имеющихся баз данных (GnomAd, ExAC). Данная замена была предварительно описана как вариант неопределенной значимости в базе данных ClinVar в гетерозиготном состоянии у пациента с ГКМП. Учитывая повторное наблюдение, гомозиготный статус и сходную клиническую картину у пациента из исследуемой когорты, данный вариант нами расценен как вероятно-патогенный. Данный клинический пример еще раз иллюстрирует тесную патогенетическую связь РКМП и ГКМП, особенно на фоне мутаций в генах, кодирующих саркомерные белки, и позволяет в ряде случаев рассматривать РКМП как наиболее тяжелый вариант ремоделирования миокарда на фоне патогенных вариантов в саркомерных генах. Возможной причиной гомозиготного статуса у данной пациентки является большая частота встречаемости родственных и внутрисемейных браков в регионе ее проживания.

Во втором случае (пациент 35) гомозиготный вариант в гене *NBLN* является редким полиморфным точечным вариантом, описанным в базах данных GnomAd и ExAC с частотой 0,009% (rs201103536, 1:1036 в финской популяции и 1:55093 в европейской популяции). Существует единичное описание данного варианта в базе данных ClinVar, где он был ассоциирован с развитием семейной формы ГКМП и трактуется как вариант неопределенной значимости. Однако аллельное состояние (гомозигота/гетерозигота) в данном описании не указано, что не позволяет полноценно сравнить данный фенотип с идентифицированным нами клиническим случаем. Мать пациента, являющаяся носителем гетерозиготного варианта rs201103536, в возрасте 71 лет не имеет клинических проявлений заболевания и признаков патологической гипертрофии миокарда по данным ЭхоКГ. Таким образом, вероятнее всего, именно гомозиготный аллельный статус пациента

является причиной более выраженного фенотипа и четко очерченного рестриктивного ремоделирования, приведшего к ТС у наблюдаемого пациента. Данное наблюдение подкрепляется и другими описаниями, в которых редкие укорачивающие варианты, встречающиеся в популяции с небольшой частотой ( $< 1:1000$ ) в гомозиготном состоянии, могут являться причиной развития кардиомиопатии [398]. В частности, таким примером может служить описание ДКМП, ассоциированной с редким вариантом в гене *NRAP* (rs201084642), развившейся на фоне гомозиготного носительства данного аллеля. Интересно отметить тесную структурно-функциональную связь описанных генов (*NEBL* и *NRAP*), оба из которых ассоциированы со структурой Z-диска, а также сходный функциональный эффект выявленных генетических вариантов (укорачивающие формы гена). Наше клиническое наблюдение в совокупности с описанным случаем подчеркивает необходимость более углубленного изучения функциональных эффектов встречающихся в популяции редких генетических вариантов, особенно в случае их гомозиготного аллельного статуса.

Основным ограничением проведенного нами исследования с использованием целевой панели генов является отсутствие возможности провести сегрегационный анализ вследствие малого количества семейных случаев заболевания, небольшого числа членов семьи и недоступности этих лиц для генетического тестирования. Существенным ограничением также является невозможность проведения углубленных функциональных исследований для большинства выявленных новых генетических вариантов, а также отсутствие возможности на современном этапе достоверно судить о роли однонуклеотидных замен в гене тайтина. В связи с гигантским размером данного гена и вследствие этого высокой частотой спонтанных событий в нем, а также сложностью функциональных исследований белка со столь высоким молекулярным весом оценить патогенетический эффект большинства выявляемых на сегодня в нем однонуклеотидных вариантов не представляется возможным. Достоверная оценка роли однонуклеотидных замен в гене *TNN* у пациентов с кардиомиопатиями и в здоровой популяции позволит

выяснить истинное значение этих вариантов в развитии и прогрессировании РКМП.

При использовании целевой панели генов нами не были учтены возможные варианты в гене *FLNC*, поскольку формирование списка генов, включенных в целевую панель, было проведено до появления первых публикаций о роли гена *FLNC* в качестве причинного при РКМП [73, 85, 302]. В связи с этим анализ возможных мутаций в гене *FLNC* был проведен методом экзомного секвенирования, и результаты данного анализа представлены в главе о РКМП, ассоциированной с поражением нейромышечной системы.

Таким образом, выявленный нами спектр генетических вариантов, ассоциированных с РКМП, подчеркивает роль цитоскелетных и Z-диск-ассоциированных белков в развитии РКМП. Проведенный скрининг широкой панели генов позволил выявить патогенные и вероятно-патогенные генетические варианты почти в половине исследованных случаев. Это позволило сделать вывод о том, что РКМП часто является результатом проявления не единственного генетического варианта, а их сочетания, подчеркивая роль механо-чувствительности и механотрансдукции в развитии рестриктивного типа ремоделирования миокарда.

### **10.3. Исследование генетической этиологии РКМП, протекающей в сочетании с поражением нейромышечной системы**

Поскольку многие гены, ассоциированные с развитием кардиомиопатий, были впервые описаны именно в связи с врожденными нейромышечными заболеваниями, изучение генетической природы последних, а также молекулярных механизмов действия мутаций, приводящих к поражению как миокарда, так и скелетной мускулатуры, позволяет глубже раскрыть фундаментальные основы и патогенез врожденных заболеваний миокарда. Первые описания генетических причин кардиомиопатий были сделаны именно в связи с исследованием миодистрофии Дюшена и Беккера [291, 396]. В дальнейшем расшифровка

молекулярных основ ламинопатий также внесла значительный вклад в изучение патогенеза кардиомиопатий с дилатационным фенотипом. В связи с этим нами были отдельно проанализированы случаи РКМП, в клинической картине которых наблюдались признаки поражения нейромышечной системы: мышечная слабость, признаки миопатии по данным НМГ, изолированное повышение уровня КФК<sub>общ.</sub>, проявления со стороны центральной и периферической нервной системы. Среди известных генов, ассоциированных с развитием РКМП, таковыми, прежде всего, являются гены *DES*, *LMNA*, *BAG3*, *CRYAB*, а также *TTN* и *FLNC* [86]. С учетом описанных клинических случаев ГКМП с нейромышечным фенотипом, а также общности некоторых механизмов развития РКМП и ГКМП, среди потенциальных причинных генов также могли рассматриваться ген *FHL1* [140, 356, 436] и гены, ассоциированные с системными нарушениями обмена и накопления: *LAMP2* и *GLA*. Использование панели с целевым обогащением позволило выявить генетическую причину заболевания в 2 из 8 случаев РКМП с нейромышечной симптоматикой. В случае десминовой кардиомиопатии этиологическая диагностика представляла собой определенные сложности в связи с атипичной презентацией заболевания в форме ГКМП и отсутствием на начальном этапе заболевания типичных признаков десминовой кардиомиопатии — дистальной миопатии и нарушений атриовентрикулярной проводимости. Поскольку наиболее типичным морфологическим признаком десминовой кардиомиопатии является наличие внутриклеточных включений десмина, отсутствие их при первичном морфологическом исследовании пациента и вызвало затруднения этиологической постановки диагноза [14, 38, 63, 242]. Это согласуется с данными о том, что появление внутриклеточных десминовых агрегатов может представлять собой одну из финальных стадий внутриклеточных процессов, а также о существовании «неагрегатных» десминовых мутаций [32, 70, 71]. В связи с этим при отсутствии десминовых агрегатов морфологическими признаками десминовой кардиомиопатии являются неспецифические внутриклеточные изменения, вероятнее всего связанные с нарушением внутриклеточной наномеханики десминовых филаментов [222]. Следовательно, отсутствие десминовых агрегатов

на начальных этапах развития кардиомиопатий не должно являться достаточным аргументом в пользу отсутствия причинных мутаций в гене десмина.

Описанный нами клинический случай десминовой кардиомиопатии представляет собой пример так называемого ундулирующего фенотипа, при котором с течением времени наблюдается переход одной фенотипической формы кардиомиопатии в другую [168, 318]. При этом трансформация на фоне десминовой кардиомиопатии гипертрофического фенотипа в рестриктивный и в последующем в дилатационный может быть ассоциирована с развитием процессов апоптоза, гибели кардиомиоцитов и фиброза миокарда. Интересно отметить, что описанные в литературе ундулирующие варианты течения кардиомиопатии со сходным изменением структурных параметров миокарда отмечались именно в случаях КМП, ассоциированных с нейромышечным фенотипом — синдром Барта, и филаминопатиями.

Вторым геном, выявленным при использовании целевой панели обогащения в нашем исследовании в связи с развитием РКМП в сочетании с нейромышечным фенотипом, является ген *BAG3*. Ассоциация данного гена с развитием кардиомиопатий известна в основном для дилатационного фенотипа. Изначально данный ген был описан в связи с возникновением тяжелых форм миофибриллярной миопатии с ранним дебютом заболевания, часто в сочетании с дилатацией полостей сердца, кахексией и нейропатией [190, 301, 330, 364]. Существуют единичные описания мутаций в гене *BAG3*, ассоциированных с развитием гипертрофического и рестриктивного фенотипа [236]. Интересно, что данная генетическая патология ассоциирована не только с поражением клеток скелетной и сердечной мышечной ткани, но и с вовлечением в патологический процесс периферической нервной системы [217]. Опубликованные к настоящему времени работы подчеркивают мультисистемный характер заболеваний, возникающих вследствие мутаций в гене *BAG3* [365].

Причины, приводящие к мультисистемному поражению на фоне мутаций в гене *BAG3*, вероятно, связаны с универсальной функцией данного белка в клетке и его участием в шаперон-опосредованной системе поддержания структурных

белков. Поскольку область Z-дисков является особенно богатой высокомолекулярными белками и подвержена значительному механическому воздействию, сохранение правильной конформации белков под действием постоянного механического стресса является важным условием нормального функционирования саркомера, области Z-дисков и реализации процесса механотрансдукции. В связи с этим нарушение белковой структуры компонентов Z-дисков, а также процессов шаперон-зависимой аутофагии и белковой деградации может являться критичным для развития патологического ремоделирования миокарда. Поскольку большинство ассоциированных с *BAG3* вариантов кардиомиопатий проявляются именно дилатационным фенотипом, можно предположить, что в основе данного процесса лежит нарушение структурных и цитоскелетных функций белков кардиомиоцитов вследствие снижения стабильности белков области Z-дисков. В то же время рестриктивный и гипертрофические фенотипы кардиомиопатий, описанные в связи с мутациями в гене *BAG3*, могут быть обусловлены собственно накоплением внутриклеточных белковых агрегатов и потому часто ассоциированы именно с миофибриллярными миопатиями. Интересным является тот факт, что полиморфные варианты гена *BAG3* ассоциированы с большей вероятностью развития ДКМП, наряду с вариантами в гене *HSPB7*, также являющимся одним из ключевых белков-шаперонов в кардиомиоцитах.

Технические достижения и значительный прогресс, связанный с внедрением технологии секвенирования нового поколения в клиническую практику, привели к выявлению новых генов, связь которых с развитием кардиомиопатий ранее не была известна. Одним из таких генов является ген филамина C (*FLNC*), известный долгое время исключительно в связи с заболеваниями нейромышечной системы и лишь недавно описанный в связи с кардиальным фенотипом [209, 401, 414]. На момент создания и применения нами панели для целевого обогащения, которая использовалась в данной работе, в литературе не было опубликовано исследований, показывающих существенный вклад гена *FLNC* в развитие кардиомиопатий, в связи с чем ген *FLNC* не был изначально включен в

исследуемую панель. При целевом секвенировании в девяти из одиннадцати случаев РКМП, протекающих с нейромышечной симптоматикой, не было выявлено патогенных и вероятно-патогенных генетических вариантов, в связи с чем для данной группы пациентов было проведено экзомное секвенирование. В результате в семи случаях нами были обнаружены мутации в гене филамина С, четыре из которых локализовались в 10 иммуноглобулиновом домене и представляли собой мутации в «горячих точках» гена.

Со времени первого описания мутаций в *FLNC* в случае семейной формы ГКМП в 2014 году количество сообщений о его роли в развитии всех видов кардиомиопатий стремительно возрастает, что делает филамин С одним из наиболее значимых белков, ассоциированных с кардиомиопатиями [29, 73, 85, 151, 192, 302, 339, 399, 401]. Как и ген *TTN*, *FLNC* связан со всеми типами кардиомиопатий, в том числе и АКМП. В большинстве случаев ассоциированных с филамином кардиомиопатий поражение миокарда является ведущим в клинической картине заболевания и сопровождается незначительными признаками поражения мышечной системы. Последнее чаще встречается среди пациентов с ГКМП и сопровождается умеренным повышением общей фракции КФК [151, 302]. Следует отметить, что единственный пациент с поражением мышечной системы среди пациентов, описанных в исследовании М. Ortiz-Genga [302] в 2016 году, был пациент с РКМП. Как правило, в случаях ГКМП и ДКМП, обусловленных аутосомно-доминантными мутациями в *FLNC*, дебют заболевания возникает на третьем или четвертом десятилетии жизни, что объясняет высокий процент семейных случаев заболевания [151, 192, 302]. Для большинства этих случаев синдром внезапной сердечной смерти и желудочковые нарушения ритма являются наиболее серьезными осложнениями. Кроме того, для кардиомиопатий, вызванных укорачивающими белок мутациями в *FLNC*, характерно формирование клинически выраженной сердечной недостаточности, вовлечение правого желудочка и трансформация в АКМП с высоким риском желудочковых нарушений ритма и внезапной смерти. Среди выявленных нами замен в гене *FLNC* большинство приводили к дебюту заболевания в раннем детском возрасте (в четырех из семи



случаев), что позволило описать новый фенотип филаминопатий, включающий РКМП с сопутствующей врожденной миопатией.

У четырех из семи пациентов дебют заболевания произошел в течение первых 3 лет жизни, а медиана возраста дебюта для всей детской группы пациентов составил  $2,5 \pm 11,4$  года. В исследовании РКМП, связанной с мутациями в гене *FLNC*, с учетом случая, опубликованного М. Ortiz-Genga с соавторами, средний возраст начала заболевания составил  $20,5 \pm 11,4$  (диапазон 2–40), в том числе у четырех пациентов дебют заболевания случился в детском возрасте [85, 151]. В целом это подчеркивает более ранний возраст презентации, ассоциированной с *FLNC* РКМП по сравнению с ДКМП и ГКМП (Рисунок 53). Важно отметить, что в исследовании, опубликованном J. Gomez с соавторами, двум пациентам была проведена трансплантация сердца в связи с тяжелой диастолической сердечной недостаточностью и рестриктивным типом наполнения левого желудочка, что еще более значимо подчеркивает связь точечных мутаций в *FLNC* с рестриктивным ремоделированием миокарда [151].

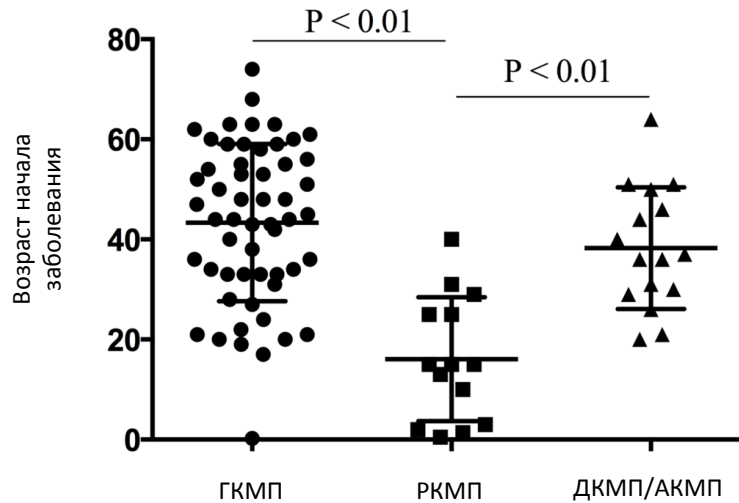


Рисунок 53 — Средний возраст дебюта кардиомиопатии, ассоциированной с мутациями в гене *FLNC*. Данные получены из статьи А. Brodehl и соавт., 2016; J. Gomez и соавт., а также по результатам настоящего исследования

Во всех четырех случаях РКМП, ассоциированных с мутациями в 10 иммуноглобулиновом домене *FLNC*, признаки миопатии проявлялись на раннем

этапе заболевания и соответствовали клиническому диагнозу врожденной миопатии с конечностно-поясным типом поражения мышц. Морфологические исследования скелетных мышц, проведенные у двух пациентов (пациент 25 и пациент 22), не выявили характерных дистрофических признаков, что согласуется с умеренным повышением КФК<sub>общ.</sub>. Наиболее типичным ранним признаком поражения мышечной системы являлся врожденный артрогрипоз, который со временем имел положительную динамику. Значимое вовлечение центральной нервной системы у одного из пациентов является довольно нехарактерным для филаминопатий, тем не менее может иметь место в свете ранее опубликованного случая ассоциированной с *FLNC* миопатии с церебеллярной атаксией [388]. В целом наши данные и ранее опубликованные работы подтверждают гипотезу о том, что РКМП, вызванная мутациями в гене *FLNC*, имеет раннюю манифестацию, часто в детском возрасте, и может сочетаться с врожденным типом конечностно-поясной миопатии и умеренным повышением КФК<sub>общ.</sub>. Следует отметить, что генетический вариант A1186V ранее был описан в связи с миофибриллярной миопатией и представлен в Лейденской базе данных нейромышечных заболеваний, однако без подробного описания вовлечения сердечно-сосудистой системы в развитие и прогноз заболевания [144].

Ассоциация патологии миокарда с нейромышечным фенотипом известна для некоторых видов кардиомиопатий, но чаще встречается в случаях ДКМП. Наши результаты, наряду с опубликованными исследованиями других авторов, демонстрируют, что РКМП, вызванная мутациями в генах, кодирующих цитоскелетные и ассоциированные с Z-дисксом белки, такие как *DES*, *CRYAB*, *BAG3* и *FLNC*, и сопровождающаяся формированием внутриклеточных белковых агрегатов, часто ассоциирована с нейромышечным фенотипом [85, 86, 157, 214, 217].

Интересно отметить, что в нашей работе исследования *in vitro* с использованием клеток линии C2C12 выявили несоответствие между экспериментальными данными, полученными на клеточной модели, и морфологическими исследованиями ткани миокарда пациентов, касающиеся

формирования белковых агрегатов. При исследовании клеток линии C2C12, трансдуцированных мутантными формами филамина С A1183L, A1186V и P2298S, каких-либо изменений внутриклеточной филаминовой сети и формирования белковых агрегатов обнаружено не было, в то время как на поздних сроках развития заболевания в миокарде пациента 22 с мутацией A1186V определялись внутриклеточные белковые агрегаты. Наличие внутриклеточных включений филамина в скелетно-мышечной ткани пациента 22, который имел наибольший возраст на момент обследования, и их отсутствие у пациента 25, несмотря на одинаковый генетический фон, может свидетельствовать о том, что формирование внутриклеточных белковых агрегатов отражает эффективность внутриклеточной системы деградации белка и не является обязательным условием клинических проявлений филаминопатий [209, 349]. Это хорошо согласуется с исследованиями других авторов [192, 302, 339, 403], демонстрирующими, что клиническая картина филаминопатий не всегда зависит от наличия внутриклеточных агрегатов. Примечательно, что одним из типичных морфологических признаков в миокарде пациента с мутацией A1186V было отсутствие филамина в области вставочных дисков — признак, ранее уже описанный в связи с кардиомиопатиями, ассоциированными с филамином [85, 339].

Спектр патологий, ассоциированных с мутациями в гене *FLNC*, включает все четыре основных типа кардиомиопатий, а именно ГКМП, ДКМП, АКМП и РКМП, а также изолированные дистальную или миофибриллярную миопатии. Локализация всех описанных ранее патогенных вариантов, связанных с различными типами кардиомиопатий и миопатий, не позволяла идентифицировать какие-либо участки гена, мутации в которых были бы преимущественно связаны с определенным фенотипом (Рисунок 26б). Однако определение позиции аминокислотных замен в структуре иммуноглобулиновых доменов выявило преимущественную локализацию всех ГКМП и РКМП-ассоциированных вариантов в петлях иммуноглобулиновых доменов. В целом полученные данные свидетельствуют о том, что именно механизм действия патогенного варианта (миссенс, нонсенс, вариант, приводящий к нарушению механизма сплайсинга), а не

расположение в структуре гена предсказывает специфическую форму кардиомиопатий и тип ремоделирования миокарда. Так, практически во всех описанных случаях ДКМП/АКМП являются следствием генетических вариантов, приводящих к потере функции белка: нонсенс-мутаций, сплайсинговых мутаций и мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания. То же относится и к большинству мутаций, связанных с миопатиями. В отличие от этого, генетические варианты, ассоциированные с ГКМП и РКМП в основном представляют собой миссенс-варианты и все, кроме двух, находятся в петлях структуры иммуноглобулиновых доменов (Рисунок 26в). Так, например, патогенные варианты V2297M, P2298S и S1624L, описанные в связи с развитием РКМП, локализованы на значительном расстоянии друг от друга в последовательности гена *FLNC*, но попадают в аналогичные области в структуре иммуноглобулинового домена и, возможно, участвуют в аналогичных белок-белковых взаимодействиях. Последняя гипотеза согласуется с работой, показывающей локализацию большинства ассоциированных с РКМП генетических вариантов в неупорядоченных доменах белка, ответственных за функциональные и структурные белок-белковые взаимодействия [387]. У четырех из пяти пациентов с мутациями в гене *FLNC* патогенный вариант локализуется в одном и том же регионе гена. Мы предполагаем, что с учетом возникновения мутаций *de novo* этот участок гена может представлять собой мутационную «горячую точку». Однако он не относится к CpG-богатым участкам, и точный механизм, приводящий к высокой частоте спонтанных мутационных событий в данном регионе, остается неизвестным.

Последним геном, описанным нами в связи с кардиомиопатией в сочетании с нейромышечным фенотипом, является ген миосприна *SMYD5*. Несмотря на то что в соответствии с критериями ACMG выявленный нами генетический вариант E683G является вариантом неопределенной значимости и не может однозначно быть трактован как патогенный или вероятно-патогенный, ассоциация гена *SMYD5* с кардиомиопатией заслуживает внимания и обсуждения в свете недавних публикаций. Впервые миосприн был описан в 2004 году как белок,

взаимодействующий с дисбиндином в клетках мышечной ткани [386]. Дисбиндин является компонентом белкового комплекса, ответственного за биогенез лизосом и мембранных структур. Таким образом, миосприн может опосредованно принимать участие в процессах внутриклеточного мембранного транспорта. Известно, что ортологи миосприна меняют свой уровень экспрессии в ответ на развитие гипертрофии и при миодистрофии Дюшена [392]. В 2006 году на мышечной модели было показано, что основным местом локализации миосприна является область костамера и Z-дисков, где миосприн взаимодействует с  $\alpha$ -актинином [120]. Позже, в 2007 году, было показано взаимодействие миосприна с десмином, а также подтверждена роль миосприна в транспорте лизосом [220]. Помимо этого, показано взаимодействие миосприна с кальциневрином и, таким образом, доказана его роль в кальциевой сигнальной системе [202]. Последний факт может иметь важное значение для функционирования нервных клеток, а также при кальций-зависимом ремоделировании мышечных клеток. В связи с этим особого внимания заслуживают работы по поиску ассоциаций генетических вариантов миосприна с различными патологическими состояниями сердечно-сосудистой и нейромышечной систем [295, 340, 357]. Все вышесказанное дает возможность рассматривать ген миосприна среди возможных причинных генов кардиомиопатий и миопатий. Интересно, что в 2011 году в результате проведенного полногеномного поиска ассоциаций, миосприн был впервые описан как ген, ассоциированный с риском развития шизофрении, позже данная ассоциация неоднократно подтверждалась другими исследователями [66, 98, 138, 167, 179, 180, 245, 417, 422, 442]. Именно основываясь на этом факте и в связи с тем, что у пациента с вариантом E683G в гене миосприна наблюдались признаки психиатрического заболевания (аутизм/шизофрения), данный ген может являться одним из причинных для развития наблюдаемой нами патологии.

#### **10.4. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *DES***

В настоящем исследовании был проведен функциональный анализ влияния различных мутаций в гене десмина на уровень  $\text{Ca}^{2+}$  внутри митохондрий ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) в мышечных клетках под действием электрической и химической стимуляции. Одной из основных задач исследования являлось сравнение эффекта агрегатных и неагрегатных мутаций в отношении уровня захвата митохондриями ионов кальция. Нами были проанализированы четыре мутации, в различной степени приводящие к формированию внутриклеточных десминовых агрегатов. Так, при мутации D399Y, нарушающей структуру хвостового домена белка, наблюдается наименее выраженный эффект в отношении полимеризации десмина [222], а мутация A357P, вызывающая нарушение структуры стержневого домена, приводит к формированию крупных внутриклеточных агрегатов, состоящих из филаментного материала [222]. Наиболее значимый эффект в отношении полимеризации десмина и формирования агрегатов отмечен в случае мутаций L345P [93, 369] и L370P [107], также приводящих к нарушению структуры стержневого домена десмина [71, 72]. В результате исследования перечисленных мутаций нами было показано, что способность митохондрий захватывать цитоплазматический кальций в ответ на повышение его концентрации в клетке зависит от нормальной организации десминовых филаментов в мышечных клетках и снижается при структурных нарушениях десмина. Данный эффект наблюдается в различной степени в зависимости от способности тех или иных мутаций в гене десмина приводить к формированию внутриклеточных десминовых агрегатов, поскольку «агрегатные» мутации приводят к наиболее выраженному нарушению захвата кальция митохондриями. Это выражается в снижении пиковых значений  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  в мутантных клетках по сравнению с контрольными клетками и наблюдается как при электрической, так и при химической стимуляции клеток.

Электрический ток и хлор-М-крезол стимулируют одни и те же внутриклеточные пути, активируя рианодиновые рецепторы и вызывая быстрое повышение уровня кальция в цитозоле и, как следствие, его захват митохондриями. Однако способность отвечать на электрическую стимуляцию свидетельствует о большей степени дифференцированности клеток в миогенном направлении, поскольку подтверждает наличие внутриклеточной системы Т-трубок и сопряжения наружной клеточной мембраны с мембраной саркоплазматического ретикулума [53]. Большинство экспериментальных исследований были проведены нами в модели дифференцированных из сателлитных клеток миотрубок, поскольку именно они обладают развитой системой Т-трубок и имеют признаки электромеханического сопряжения. Так как эти первичные клетки, полученные из сателлитных клеток *m. soleus* мыши, не могут быть генетически модифицированы стандартными способами с применением кальций-фосфатного буфера и липофектамина, нами была предложена эффективная система генетической модификации первичных мышечных клеток посредством лентивирусной трансдукции. Трансдукция мышечных клеток конструкцией с GFP и, параллельно, мутантными формами гена десмина подтвердила высокую эффективность генетической модификации клеток и возможность использования данной модели для последующих экспериментов.

Известно, что митохондрии способны поглощать кальций из цитоплазмы через высокоселективный митохондриальный  $\text{Ca}^{2+}$ -унипортер (MCU) и эта способность обеспечивается их локализацией в так называемых микродоменах за счет близости митохондрий к местам высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума [205, 334, 345]. Ключевой характеристикой микродоменов является высокая концентрация кальция, на несколько порядков больше, чем в цитоплазме [345], в связи с чем мы полагаем, что описанное нами влияние десминовых мутаций на захват кальция митохондриями может быть результатом пространственной дезинтеграции митохондрий и саркоплазматического ретикулума. Вследствие нарушения филаментозной структуры десмина и формирования десминовых агрегатов митохондрии не удерживаются в

непосредственной близости от саркоплазматического ретикулума, что приводит к разрушению структуры «митохондриально-кальциевых» микродоменов и снижению захвата кальция митохондриями. Наша гипотеза согласуется с данными V. Saks и соавторов [355], которые показали снижение дыхательной активности митохондрий в мышечных клетках мышей, нокаутных по гену десмина, только в условиях цельной клетки, тогда как исследования изолированных митохондрий вне цитоплазматического окружения не выявили подобного эффекта, что еще раз подтверждает значимость внутриклеточной среды и микроокружения для функционирования митохондрий [89, 250, 279].

Поскольку измерение концентрации ионов кальция в цитозоле не показало разницы между клетками, трансдуцированными геном десмина дикого типа и мутантными генами десмина, нами был сделан вывод о том, что мутантные формы десмина не влияют в значимой степени на высвобождение ионов кальция из саркоплазматического ретикулума и что выявленные изменения концентрации ионов кальция внутри митохондрий не являются следствием изменения концентрации цитоплазматического кальция.

Основной функцией изменения концентрации ионов кальция внутри митохондрий является регулирование синтеза АТФ [69, 191, 279], а также модулирование цитозольной концентрации кальция [329] и индукция апоптоза посредством формирования транзиторных пор митохондриальной проницаемости (МПП) [103, 293]. Таким образом, снижение захвата ионов кальция митохондриями может приводить к ингибированию синтеза АТФ и, как следствие, к развитию десмин-ассоциированной миопатии и кардиомиопатии [67]. В дополнение повышение митохондриальной концентрации ионов кальция может являться важным триггером аутофагии и формирования аутофагосом [344]. Ранее нами было показано, что одним из морфологических признаков миокарда трансгенных мышей, несущих мутацию L345P в гене десмина, является накопление местных белковых отложений и внутриклеточного аморфного материала [216]. Другими авторами также было продемонстрировано накопление внутриклеточных агрегатов и снижение активности аутофагии вследствие мутаций в гене *CRYAB* при



ассоциированной с десмином кардиомиопатии [265, 271, 419]. Таким образом, нарушение процессов аутофагии и митофагии в связи с низкой концентрацией митохондриального кальция может являться одним из механизмов, приводящих к развитию десминовой кардиомиопатии и миопатии и, в частности, рестриктивного фенотипа со сниженной комплаентностью ткани миокарда.

Поскольку ранее нами было показано, что у мышей, несущих мутацию L345P в гене десмина, отмечался повышенный уровень  $[Ca^{2+}]_m$  как в клетках скелетных мышц, так и в кардиомиоцитах, полученные в настоящей работе с использованием трансдуцированных миотрубок данные частично противоречат опубликованным ранее [67]. Возможным объяснением может служить низкий уровень экспрессии мутантного десмина в модели трансгенных мышей с мутацией L345P и отсутствие вследствие этого агрегатов десмина, характерных для данной мутации в клеточной модели при высоком уровне экспрессии трансгенного белка. Вероятно, эффект, наблюдаемый в модели трансгенных мышей, в основном объясняется нарушениями наномеханики десминовых филаментов при отсутствии значимых структурных дефектов и агрегатов [222]. Таким образом, различные виды структурно-функциональных нарушений десмина, такие как изменения наномеханики, структурные дефекты и агрегатообразование, могут оказывать различное влияние на регуляцию захвата ионов кальция митохондриями.

Данные, полученные нами с применением технологии анализа клеточного метаболизма «Sea horse», продемонстрировали, что десмин дикого типа и мутантные формы десмина имеют очень схожие графики митохондриального дыхания, определяемые по уровню потребления кислорода, что свидетельствует о сохранении ответа на воздействие ключевых индукторов и ингибиторов митохондриального дыхания после лентивирусной трансдукции клеток. Вместе с тем клетки, несущие ряд десминовых мутаций (345, 357 и 399), демонстрировали значимое снижение уровня стимулированного дыхания в ответ на применение FCCP. Данный факт может косвенно свидетельствовать о нарушении продукции АТФ под воздействием различных стимулов и объяснять развитие энергетической недостаточности при ассоциированных с десмином миопатий и кардиомиопатий

[59, 116, 160, 264]. Схожие данные ранее были получены и другими авторами на различных моделях патологии ассоциированных с десмином белков, в частности плектина и альфа-кристаллина. В целом полученные нами данные на клеточной модели в условиях электромеханического сопряжения подтверждают не только структурные, но и функциональные нарушения митохондрий и впервые соотносят полученный эффект со структурным типом мутации в гене десмина.

В данной работе мы не получили подтверждения гипотезы о нарушении функции потенциалзависимого натриевого канала (Nav1.5) под влиянием с.735+1G>A мутации в гене десмина, несмотря на опубликованные ранее данные о дисфункции натриевого канала вследствие агрегатных мутаций, ассоциированных с нарушением функции промежуточных филаментов [182]. Этому могут быть несколько объяснений. Во-первых, в используемой нами модели кардиогенно дифференцированных iPСК на фоне с.735+1G>A мутации *DES* нами не были детектированы внутриклеточные агрегаты. Известно, что их формирование является следствием нарушения баланса в системе синтеза и деградации белка, полимеризации промежуточных филаментов и аутофагии. Данный процесс активно наблюдается в связи со старением клеток, детектируется в мышечных тканях пациентов часто не сразу, а спустя декады после начала заболевания, а в клеточных культурах определяется спустя много пассажей *in vitro*. Возможно, именно формирование белковых агрегатов с вовлечением в их состав многих цитоскелетных белков и белков-шаперонов, а не первичное нарушение структуры филаментов и цитоскелетно-мембранных взаимодействий, лежит в основе дисфункции ионных каналов вследствие мутаций в гене десмина. Еще одной возможной причиной, объясняющей отсутствие снижения натриевого тока на фоне с.735+1G>A варианта в гене десмина, является изменение более тонких функциональных параметров и проводящих свойств канала, таких как кривые быстрой и медленной инактивации и восстановление из инактивации. Возможно также, что изменение функции Nav1.5 может иметь специфический для каждой конкретной мутации характер и наблюдаться только при определенных патогенных вариантах десмина. Таким образом, несмотря на полученные предварительно

отрицательные данные о влиянии с.735+1G>A варианта в гене десмина на функцию потенциалзависимого натриевого канала, продолжение исследований в этом направлении с расширением спектра изучаемых мутаций и электрофизиологических характеристик, а также клеточных моделей, является актуальным и клинически значимым.

### **10.5. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *LMNA***

В нашей работе мы исследовали влияние мутаций в гене ламина на дифференцировку прогениторных клеток в различных направлениях: адипогенном, остеогенном и миогенном, поскольку большинство поражаемых при ламинопатиях тканей являются тканями мезенхимного происхождения — мышечная система и миокард, жировая и костная ткани. Большинство исследований, посвященных механизмам реализации эффектов мутаций в гене *LMNA* в отношении экспрессии генов, выполнены на модели гиперэкспрессии прогерина — мутантной формы ламина, ассоциированной с развитием прогерии Хатчинсона–Гилфорда, [260, 360]. Наша работа является одной из первых, показывающих влияние одновременно нескольких тканеспецифичных мутаций, не ассоциированных с прогерией, на способность к дифференцировке и экспрессионный профиль именно ММСК. Нами впервые было показано, что введение мутантного ламина в ММСК приводит к потере их способности пролиферировать в условиях низкой плотности посева клеток, что является обязательным атрибутом стволовой клетки, и таким образом демонстрирует снижение их прогениторного потенциала. Полученные нами данные в отношении не прогероидных мутаций согласуются с данными, полученными другими авторами при исследовании прогероидных мутаций, а также при подавлении экспрессии ламина посредством siRNA, в которых было показано наличие ранних маркеров тканеспецифичной дифференцировки в не индуцированных к дифференцировке ММСК [294, 360].

Несмотря на обилие работ в области экспериментального изучения влияния мутаций в *LMNA* на дифференцировку прогениторных клеток, большинство результатов носят противоречивый характер как в отношении адипоцитарной дифференцировки, так и в отношении остеогенной дифференцировки ММСК [58, 82, 294, 336, 430]. В то время как в одних работах показано снижение остеогенной дифференцировки ММСК в условиях супрессии ламина А/С под действием siRNA, в работах, выполненных на клетках, трансдуцированных мутантной формой ламина — прогерином, показано увеличение остеогенного потенциала. Данное противоречие во многом может объясняться различием исследуемых клеточных моделей, а также тем, что доминантно-негативный эффект вводимого мутантного гена отличается от ситуации с подавлением экспрессии или гиперэкспрессией. В нашей работе мы продемонстрировали, что мутантные формы ламина могут увеличивать адипогенный и остеогенный потенциал ММСК, а также то, что данный эффект зависит от типа мутации и ассоциированной с ней клинической нозологии. Увеличение способности к направленной дифференцировке на фоне мутаций в гене ламина А/С сопровождается снижением прогениторных свойств стволовых клеток, что выражается в снижении их способности к пролиферации в условиях низкой плотности и отсутствия клеточного микроокружения [27].

В нашей работе было показано, что в присутствии мутантных форм ламина, увеличение экспрессии некоторых тканеспецифичных маркеров не всегда напрямую коррелирует со способностью ММСК дифференцироваться в соответствующем направлении. Сходное наблюдение о несоответствии конечного результата тканеспецифичной дифференцировки и ранней экспрессии некоторых тканеспецифичных маркеров было описано в работах R. Boguslavskiy и A. Nakelien на модели клеток линии C2C12, а также с использованием клеток 3T3, несущих мутацию R482W гена ламина А/С [82, 128, 162, 400]. Таким образом, итоговый клеточный фенотип под воздействием мутаций в гене ламина может формироваться вследствие неэффективной активации и/или дисрегуляции некоторых основных тканеспецифичных транскрипционных программ. Поэтому с целью выявления ранних изменений активации транскрипции генов нами была

проанализирована экспрессия панелей тканеспецифичных генов на начальных этапах адипогенной и остеогенной дифференцировки (3-й день для адипогенной и 4-й день для остеогенной дифференцировки). В результате анализа данных мультиплексных панелей нами было показано, что для каждой мутации характерен свой специфический профиль изменения экспрессии генов, и этот профиль является сходным для мутаций, приводящих к развитию сходных патологий. Другими словами, мутации, ассоциированные с одним и тем же типом поражения тканей, имеют большее количество генов с аналогичным изменением профиля экспрессии. Так, например, кластеры дифференциально экспрессирующихся генов сходны для мутаций R582L и G456D, ассоциированных с частичной семейной липодистрофией. Такой же тип кластеризации наблюдается и при мутациях, приводящих к МАД. В целом полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что для каждой мутации в гене ламина характерен свой собственный профиль изменения экспрессии генов, что, по всей вероятности, и обуславливает фенотипическую вариабельность ламинопатий.

Одним из возможных механизмов, лежащих в основе выявленных изменений экспрессии генов, является участие белков ядерной ламина в эпигенетической регуляции генов и пространственной организации хроматина [111, 324, 382, 411]. В подтверждение этого предположения нами было показано, что под влиянием всех исследованных нами мутаций в гене ламина существенно увеличивается общая активность гистоновых деацетилаз в ММСК. Наши данные согласуются с ранее опубликованными исследованиями, показывающими что влияние ламина А/С на дифференцировку стволовых клеток реализуется посредством взаимодействия ядерной ламина с гистоновыми деацетилазами [237]. По данным тех же авторов регулирование активности гистоновых деацетилаз является одним из ключевых механизмов, обеспечивающих вклад ядерной ламина в процессы механотрансдукции [247, 391].

Обобщая все полученные нами данные, были сделаны выводы о том, что под воздействием мутаций в гене ламина снижается способность ММСК к клональной экспансии, а также увеличивается их способность к дифференцировке в

адипогенном и остеогенном направлениях. Этот эффект может отражать состояние как бы «пред-коммитированности» прогениторных клеток под воздействием мутантных вариантов белка. Наибольший интерес вызывает тот факт, что изменения экспрессии генов при каждом типе мутаций носят тканеспецифичный характер и ассоциированы с фенотипом ламинопатий.

Поскольку развитие ассоциированных с ламином кардиомиопатий и миопатий связано в основном с поражением кардиомиоцитов и клеток скелетной мышечной ткани, в нашей работе были более детально рассмотрены изменения экспрессионного профиля и нарушение способности к дифференцировке миоцитов под воздействием мутаций в гене ламина [34]. В связи с тем, что при мультиплексном анализе экспрессии генов только одна среди изучаемых мутаций, G232E, приводила к развитию патологии миоцитов, нами был проведен дополнительный анализ в отношении данной мутации, а также мутации, ассоциированной с развитием кардиомиопатии (R571S). Мы показали, что анализируемые мутации снижают способность клеток к миогенной дифференцировке, а именно к слиянию и формированию миотрубок. Формирование коротких миотрубок было связано со сниженным индексом слияния клеток. В дополнение к вышеописанному, клетки, несущие мутантные формы ламина, часто демонстрировали «аномальную» морфологию, описанную ранее [88]. Авторы показали, что под влиянием мутантных форм ламина ядра не расходятся к полюсам, а накапливаются в центре дифференцирующейся миотрубки, в отличие от нормального процесса миогенеза. Другими авторами, исследовавшими ассоциированную с миодистрофией Эмери–Дрейфуса мутацию R453W в *LMNA*, было показано снижение способности мутантных клеток к дифференцировке и формированию многоядерных трубок, а также снижение уровня экспрессии транскрипционного фактора *MyoG* при неизменном уровне экспрессии *MyoD* [126]. Позже в работах других авторов также было показано снижение экспрессии *MyoG* при неизменном уровне экспрессии *Myf5* и *MyoD* под воздействием R453W мутации в гене ламина [162]. Этот факт может

свидетельствовать об участии ламина A/C и в регуляции сигнальных путей миогенеза Rb/E2F и Rb/MyoD [128, 314].

В то же время на первичных культурах клеток, нокаутных по гену ламина, не было показано влияния полного отсутствия ламина на индекс слияния клеток при сравнении с клетками дикого типа. Так, в первичной культуре мышечных миобластов, полученных от мышей, нокаутных по гену *LMNA*, было продемонстрировано снижение скорости пролиферации клеток при неизменном индексе слияния в процессе дифференцировки [102]. Наблюдаемые различия в способности к дифференцировке клеток, возможно, объясняются различиями в используемых клеточных линиях (C2C12 и первичные мышечные миобласты), а также отличием влияния мутантных форм ламина от его полного отсутствия в клетке.

Изменение экспрессии тканеспецифичных факторов *Pax3*, *Mrf5* и *MyoD* под влиянием мутаций в гене ламина на ранних этапах мышечной дифференцировки клеток C2C12 сходно с наблюдаемым в ММСК на начальных этапах адипогенной и остеогенной дифференцировки. Наблюдаемое нами повышение экспрессии тканеспецифичных факторов в первые сутки после индукции дифференцировки в сочетании со снижением эффективности конечной дифференцировки согласуется с гипотезой о нарушении регуляции тканеспецифичных генов в прогениторных клетках, а также о низкой эффективности самого процесса направленной дифференцировки под влиянием мутаций в гене ламина [136, 309]. Некоторые отличия полученных нами данных относительно изменения экспрессионного профиля, от описанных в литературе могут быть связаны с типом изучаемой клеточной линии, способом модификации клеток и длительностью дифференцировки.

Среди изучаемых нами генов, связанных с миогенезом и кардиомиогенезом, впервые было исследовано влияние мутантных форм ламина на экспрессию гена *Myotaker*. Данный ген экспрессируется в процессе клеточного слияния и формирования многоядерных миофибрилл в эмбриогенезе, а также в процессе регенерации мышечной ткани во взрослом организме [277, 278]. Его роль в

миогенезе и формировании миофибрилл была показана относительно недавно, и наше исследование является первым, показавшим изменение экспрессии *Myomaker* в присутствии мутантных форм ламина А/С. Поскольку ранее было показано, что *Myomaker* имеет в составе своего промотора сайты связывания транскрипционных факторов MyoD и MyoG, снижение его экспрессии, возможно, объясняется дерегуляцией экспрессии данных генов под влиянием мутантных форм ламина А/С. Изменением экспрессии гена *Myomaker*, вероятно, объясняется и снижение длины миотрубок, а также уменьшение индекса слияния клеток линии C2C12 в процессе миогенной дифференцировки. При этом изменение экспрессии *Myomaker* было наиболее выражено именно для мутации в LMNAG232E, ассоциированной с миодистрофическим фенотипом, и наблюдалось уже через 24 часа после индукции дифференцировки, в то время как в присутствии мутации LMNAR571S, ассоциированной с развитием кардиомиопатии, изменение экспрессии гена *Myomaker* и других генов, кодирующих факторы миогенеза, наблюдалось только на более поздних этапах, через 7 суток после индукции дифференцировки.

Принимая во внимание, что процессы фиброза в миокарде и адипогенеза в мышечной ткани лежат в основе ключевых патоморфологических изменений при ламинопатиях, остается открытым вопрос о типе и источниках прогениторных клеток, для которых характерны процессы несостоятельной тканеспецифичной дифференцировки, фиброза и адипогенеза. Если в качестве клеток-предшественников скелетной мышечной ткани, могут рассматриваться сателлитные мышечные клетки и стромальные мышечные клетки, то наличие пула клеток-предшественниц в ткани миокарда все еще является предметом активной научной дискуссии. По аналогии с одной из существующих гипотез развития АКМП, в соответствии с которой именно клетки-предшественники миокарда, являются источником адипоцитов при АКМП, формирование полей фиброза при АКМП и РКМП вследствие мутаций в гене *LMNA* также может происходить за счет данного типа клеток [255, 317].

Обобщая полученные нами результаты и данные, опубликованные другими авторами в отношении влияния мутаций в гене ламина на процесс миогенной



дифференцировки, можно сделать вывод, что мутации в *LMNA*, ассоциированные с развитием мышечной дистрофии Эмери–Дрейфуса и кардиомиопатии с преимущественно кардиальным и скелетно-мышечным фенотипом, влияют на способность мышечных клеток к слиянию и на экспрессию основных маркеров миогенной дифференцировки. Этот вывод согласуется с нашей гипотезой о тканеспецифичном эффекте ламиновых мутаций и об избирательном нарушении направленной дифференцировки при том или ином типе ламиновых мутаций.

### **10.6. Молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *TNNI3***

В нашей работе представлено несколько случаев РКМП, ассоциированной с мутациями в гене сердечного тропонина I (*TNNI3*). Мутации в этом гене были описаны одними из первых в связи с развитием РКМП [204, 213, 284]. Среди первых клинических случаев РКМП, ассоциированных с *TNNI3*, была описана семья с мутацией D190G, в которой у некоторых членов семьи заболевание проявлялось в виде рестриктивной кардиомиопатии, а у некоторых в виде ГКМП [281]. Именно в этой работе авторы впервые продемонстрировали патогенетическую общность данных фенотипов, а также подтвердили высокую частоту мутаций в гене *TNNI3* среди пациентов с РКМП. В той же работе было продемонстрировано, что при морфологическом исследовании миокарда пациентов с РКМП на фоне мутаций в гене *TNNI3* часто определяются гипертрофия КМЦ, фиброз и феномен дисконкомплексации мышечных волокон — признаки, ранее считавшиеся типичными для ГКМП. Несмотря на то что рестриктивный тип кровенаполнения левого желудочка и снижение конечно-диастолического объема левого желудочка однозначно являлись аргументами в пользу определения данных случаев как РКМП, у данных пациентов также выявлялись признаки умеренной гипертрофии левого желудочка. В описанных нами случаях также при морфологическом исследовании определялись признаки выраженного фиброза, дисконкомплексации мышечных волокон и гипертрофии КМЦ, что в целом

согласуется с морфологической картиной миокарда при РКМП на фоне мутаций в генах белков саркомера [61]. В целом полученные данные подтверждают, что при кардиомиопатиях, ассоциированных с мутациями в гене *TNNI3*, может наблюдаться различное сочетание морфологических, гемодинамических и эхокардиографических признаков, характерных как для РКМП, так и для ГКМП, с превалированием одного из этих фенотипов.

В настоящее время общепризнанным механизмом развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в генах сердечных тропонинов, является изменение чувствительности к ионам кальция. После описания кристаллической структуры актин-миозинового комплекса, обобщенные результаты работ последних 15 лет показали, что вне зависимости от конкретной локализации мутаций в гене, большинство из них затрагивают регуляторные сайты, динамично и разнонаправленно модулирующие чувствительность тонких филаментов к ионам кальция [221, 385]. Так, было показано, что ассоциированные с ГКМП мутации в генах белков актин-миозинового комплекса увеличивают чувствительность к ионам кальция, а ассоциированные с развитием ДКМП мутации приводят к ее уменьшению [231, 283, 383, 410]. Поскольку экспериментальные подходы с исследованиями на животных продемонстрировали перспективность использования фармакологических субстанций и генно-инженерных методов, снижающих чувствительность к ионам кальция при РКМП, полученные нами данные о молекулярном патогенезе и биофизических механизмах реализации мутаций в генах тропонинового комплекса являются крайне важными для разработки персонафицированной терапии при РКМП.

Описанная нами у пациента с РКМП аминокислотная замена в положении R170 локализована в С-терминальном участке сердечного тропонина I (фрагмент между аминокислотами 169–210). В соответствии с гипотезой, предложенной ранее N. Takeda и соавторами, этот участок отвечает за взаимодействие тропонина I с актином и тропомиозином при низкой концентрации ионов кальция и вместе с ингибиторным регионом (аминокислоты 137–148) обеспечивает молекулярное разобщение актина и миозина в момент диастолы [385]. Таким образом, мутации,

затрагивающие данный фрагмент белка, могут нарушать ингибиторные свойства тропонина в отношении сердечного актина. Эта же область нарушается и при мутации D168TfsTer8 со сдвигом рамки считывания, описанной нами в клиническом примере № 1 (пробанд 20). Недостаточная реализация ингибиторного эффекта тропонина и тропомиозинового комплекса в отношении тонких филаментов может приводить к неполной диссоциации актин-миозинового комплекса во время диастолы и, таким образом, обуславливать нарушение расслабления и развитие диастолической дисфункции вплоть до рестриктивного фенотипа. В соответствии с данным предположением скорость диссоциации комплексов обеих мутантных форм тропонина (R170G и R170W) с тропомиозином, определяемая методом плазмонного резонанса, была существенно снижена (> 80%). Это подтверждается увеличением силы связывания мутантных форм тропонина с тропомиозином и, для сTnI-R170G, с актином. В целом полученные данные могут свидетельствовать о нарушенном ингибировании актиновых филаментов в присутствии мутантных форм сTnI-R170G и сTnI-R170W сердечного тропонина. Данное предположение подтверждается и увеличением чувствительности актин-миозинового взаимодействия к ионам кальция при исследовании изолированных перфорированных миоцитов. Схожие данные неоднократно были опубликованы и другими авторами в отношении мутаций в гене *TNNI3*, приводящих к развитию РКМП и ГКМП [231, 383, 410]. Однако в ряде экспериментов наши данные, полученные при исследовании восстановленного белкового комплекса, частично расходятся с данными, полученными на изолированных миоцитах, и не подтверждают увеличения чувствительности к ионам кальция. Одним из возможных объяснений этому может являться ограниченное участие белков в составе восстановленного актин-тропонин-тропомиозинового комплекса и наличие более физиологичной системы регуляции миофиламентов в изолированных миоцитах. Косвенно это предположение подтверждается нашими данными о непосредственном участии миозин-связывающего белка С в проявлении эффекта мутантных форм сердечного тропонина I. В присутствии фрагмента MyBPC C0–C2 повышается

чувствительность актин-миозиновой S1 АТФ-азы и тропонина I дикого типа (сTnI-WT) к ионам кальция. Схожий эффект наблюдается и при включении в комплекс мутантных форм тропонина (сTnI-R170G и сTnI-R170W). Важно отметить, что степень изменения активности актин-миозиновой S1 АТФ-азы напрямую зависит от аминокислотной замены и не одинакова для тропонина дикого типа и мутантных его форм. Недостаточный сдвиг кривой зависимости влево при исследовании изолированного комплекса по сравнению с исследованием перфорированных миоцитов (Рисунок 42), по всей вероятности, могут быть связаны с эффектом и других белков, помимо MyBPC входящих в состав актин-миозинового комплекса. Недавно было показано, что развитие РКМП может быть связано с мутациями в генах, кодирующих сердечный тропонин С, а также тропонин Т, легкие цепи миозина и компоненты М- и Z-линии, включая самый большой белок млекопитающих — тайтин. Каждый из этих белков может участвовать в молекулярной реализации эффекта мутантных форм тропонина I и вносить вклад в характер взаимодействия актиновых филаментов и актин-миозиновой АТФ-азы с ионами кальция. Различие в степени ингибиторного эффекта мутаций сTnI-R170G и сTnI-R170W, связанное с заменой на неравнозначные аминокислоты, может отчасти объяснять и различие в фенотипическом проявлении этих мутаций у описанных пациентов. Так, замена R170W, оказывающая более значимый эффект на взаимодействие тропонина с компонентами тонких филаментов, связана с более ранним проявлением заболевания и более агрессивным его течением. В то же время фенотипическое различие может быть обусловлено и рядом сопутствующих факторов внешней среды и генетических детерминант. В частности, определенное влияние может оказывать носительство редких генетических вариантов с низкой частотой в популяции [226, 295, 377, 432]. Это отчасти подтверждается наличием сопутствующих генетических вариантов у пробанда 21 (SCN4B L51P и SYNE2 R2249X, Таблица 10), которые в соответствии с классификацией ACMG расцениваются как варианты неопределенной значимости. Роль этих, а также других редких генетических вариантов в реализации фенотипа конкретной

мутации является предметом актуального научного поиска и требует дополнительных исследований в данном направлении.

### **10.7. Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции**

Наличие рестриктивного типа кровенаполнения ЛЖ при СН-сФВ является фактором неблагоприятного прогноза пациентов с ХСН и определяет темпы прогрессирования атриомегалии и риск развития наджелудочковых нарушений ритма у пациентов с ХСН приобретенного генеза. Исследованию генетических детерминант, ассоциированных с развитием диастолической дисфункции миокарда при мультифакториальных заболеваниях сердечно-сосудистой системы — гипертонической болезни, ИБС, диабетической кардиопатии — посвящено ограниченное количество исследований, в то время как ассоциация определенных генетических детерминант с развитием СН-нФВ неоднократно продемонстрирована многими авторами [261, 295, 322, 433]. Расширение спектра генетических причин идиопатической РКМП позволило предполагать, что полиморфные варианты ряда генов могут являться факторами, ассоциированными с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока при ХСН и не наследственного генеза. В частности, на основе анализа литературных данных и собственных результатов исследований нами для последующего анализа были выбраны полиморфные варианты генов саркомерных белков и гена *RBM20*, отвечающего за сплайсинг белков цитоскелета в группе пациентов с ХСН ненаследственной природы. При исследовании взаимосвязи генетических вариантов в гене *RBM20* с развитием рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции нами не было обнаружено достоверных ассоциаций. Однако была продемонстрирована связь исследуемых генетических вариантов в данном гене со снижением насосной функции миокарда и дилатацией полости левого предсердия. Так, генотип GG был достоверно ассоциирован с большим риском развития систолической дисфункции и, соответственно, снижением фракции выброса ЛЖ.

Данное наблюдение в целом согласуется с большинством опубликованных в международной литературе данных. В настоящее время хорошо известна роль белка RBM20 в обеспечении сплайсинговых событий генов, кодирующих белки саркомера [158, 425]. В свою очередь, регуляция длины и растяжимости таких внутри- и внесаркомерных цитоскелетных белков, как тайтин, *LDB3*, а также белков, участвующих в обеспечении кальциевого сигналинга и гомеостаза (рианодиновый рецептор 2 типа, кальций-кальмодулин-зависимая киназа дельта), является одним из основных механизмов реализации закона Франка–Старлинга и, соответственно, одним из основных факторов, обеспечивающих ремоделирование миокарда. С этой точки зрения взаимосвязь генетических вариантов *RBM20* и сократительной функции миокарда объяснима и имеет многочисленные экспериментальные подтверждения [43, 152, 175, 426, 434]. Так, показано, что путем воздействия на степень экспрессии белка RBM20 в эксперименте можно модулировать диастолическое расслабление миокарда и его сократительную функцию [175, 276]. Более того, в недавних работах была продемонстрирована зависимость экспрессии белка RBM20 от уровня инсулина, и показано вовлечение оси инсулин-киназный каскад-гипертрофический ответ в регуляцию спектра изоформ тайтина [445]. В этой связи полученные нами данные о связи генетических вариантов *RBM20* с дилатацией левого предсердия у пациентов с различными формами сердечной недостаточности согласуются с гипотезой о влиянии белка RBM20 на комплаентность кардиомиоцитов и процесс эксцентрического ремоделирования. Однако, несмотря на данные о влиянии уровня RBM20 на экспрессию низкокомплаентной формы тайтина N2B, убедительных данных о связи полиморфных вариантов гена *RBM20* с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока у пациентов с негенетически обусловленной ХСН в нашем исследовании получено не было.

Исследование взаимосвязи полиморфных вариантов гена *MADD* с процессами гипертрофии миокарда и диастолической дисфункции выявило ряд значимых ассоциаций. Для обоих исследуемых полиморфных вариантов (rs2290149 и rs10838692) гена *MADD* в нашем исследовании была

продемонстрирована связь с развитием ГЛЖ, сердечной недостаточности с сохранной фракцией выброса и наличием дилатации левого предсердия. Несмотря на то, что первичной целью нашего исследования являлся поиск генетических детерминант развития рестриктивного типа кровенаполнения левого желудочка, в рамках данного направления исследования нами были получены ограниченные данные. Так, нам удалось показать значимую связь с развитием рестриктивного типа диастолической дисфункции только для rs10838692, а точнее, продемонстрировать протективную роль генотипа CC в отношении рестриктивной физиологии. С учетом ассоциации генотипа CC в варианте rs10838692 с развитием ХСН со сниженной фракцией выброса, можно в целом предполагать наличие связи этого генотипа с эксцентрическим ремоделированием и увеличением комплаентности миокарда. Это согласуется с результатами анализа ассоциаций данного генотипа с остальными эхокардиографическими и клиническими параметрами. В частности, показана достоверная ассоциация генотипа TT с развитием ГЛЖ, концентрического типа ГЛЖ, развитием ХСН с сохранной фракцией выброса и дилатацией ЛП. В целом выявленные ассоциации варианта rs10838692 демонстрируют связь генотипа TT с гипертрофией миокарда и развитием диастолической дисфункции, а генотипа CC с развитием ХСН со сниженной фракцией выброса и отсутствием предрасположенности к рестриктивной физиологии. Сходные по сути закономерности были продемонстрированы нами и для варианта rs2290149 гена *MADD*. В частности, генотип TT был ассоциирован с развитием ГЛЖ, ХСН с сохранной фракцией выброса и дилатацией ЛП. Суммируя полученные данные, можно сделать вывод о потенциальном участии гена *MADD* в процессе ремоделирования миокарда. Учитывая ассоциации генотипа TT с ГЛЖ, а также принимая во внимание то, что ГЛЖ является основным фактором, определяющим развитие диастолической дисфункции миокарда, большинство выявленных нами ассоциаций, вероятно, связано с развитием ГЛЖ и, как следствие, диастолической дисфункции и дилатации предсердий. К сожалению, недостаточные размеры исследуемой выборки не позволили в данной работе провести отдельный анализ связи

полиморфных вариантов гена *MADD* с диастолической дисфункцией и рестриктивным кровотоком вне зависимости от наличия ГЛЖ. Однако с учетом знаний об основных гемодинамических закономерностях формирования ХСН с сохранной фракцией выброса можно предположить, что вклад гена *MADD* реализуется в значительной степени через влияние на развитие ГЛЖ. Это находит подтверждение в тех немногих работах, которые были посвящены исследованию значимости данного гена в процессе ремоделирования миокарда (Рисунок 54). Основной в данной области является работа, в которой была показана значимая ассоциация гаплотипа rs753993, rs7124958, rs2290149 и rs10838692 данной хромосомной области с развитием ГЛЖ в популяции тайваньских пациентов с артериальной гипертензией, а также пациентов с ГКМП в российской популяции [36]. Поскольку описанные в данном исследовании и в нашей работе rs находятся в некодирующей части гена, механизм реализации выявленных связей остается не до конца ясным. Известно, что в непосредственной близости от данной хромосомной области находится ген *MYBPC3*, и варианты rs2290149 и rs10838692 теоретически могут располагаться в области его регуляторных участков.

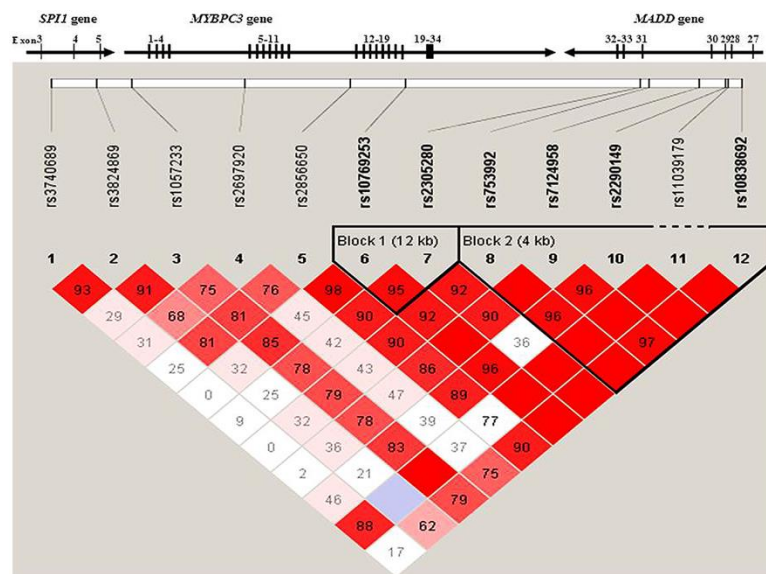


Рисунок 54 — Локализация интронных SNP гена *MADD* в непосредственной близости от последовательности гена *MYBPC3* (заимствованно из С. Wu и соавторы, 2012 г.)



С учетом важности миозин-связывающего белка С в развитии ГЛЖ и адаптации миокарда к гемодинамическому стрессу, такой механизм может являться одним из путей реализации эффекта данных генетических вариантов. В то же время сам белок MADD был описан в связи с регуляцией клеточного цикла и опухолевого роста. Показано его тесное взаимодействие с TNF1 $\alpha$  и участие в опосредованном воспалительном, пролиферативном и антиапоптотическом ответе [80, 188, 229, 288, 296]. Интересным представляется тот факт, что недавно локус, включающий ген *MADD*, был описан как один из генетических локусов, определяющих ответ мышечной ткани на инсулиновую нагрузку и базальный уровень глюкозы [104, 181, 183]. Также была показана связь локуса гена *MADD* с развитием ИБС в китайской популяции [420]. В связи с этим детальная расшифровка механизма его действия в скелетных и сердечных миоцитах может являться ключом к более детальной расшифровке процесса гипертрофии.

## ВЫВОДЫ

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

существенного вклада в определение риска неблагоприятного исхода хронической сердечной недостаточности в течение 1 года.

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

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентов с дебютом идиопатической рестриктивной кардиомиопатии в возрасте до 5 лет, пациентов с рестриктивной кардиомиопатией на фоне патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе саркомерных генов, а также пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией, осложненной постоянной формой фибрилляции предсердий, рекомендовано рассматривать в качестве потенциальных кандидатов для проведения ортотопической трансплантации сердца.
2. Для оценки риска развития летального исхода вследствие хронической сердечной недостаточности в течение года у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии возможно использование прогностических шкал SHFM, MAGGIC, 3С-HF и MUSIC.
3. В качестве наиболее информативной шкалы оценки риска развития летального исхода у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии рекомендовано использование шкалы 3С-HF.
4. В группе пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии целесообразно проведение оценки риска развития желудочковых нарушений ритма и определение показаний к своевременной установке имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора.
5. Для оценки семейного анамнеза и определения семейных случаев заболевания у членов семей пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии в качестве признаков проявления заболевания рекомендовано рассматривать не только рестриктивную кардиомиопатию, но и наличие врожденных пороков сердца, нарушений ритма и проводимости, а также признаков некомпактного миокарда левого желудочка.
6. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс нейромышечной системы пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение детального неврологического обследования, включающего клиническую оценку, электронейромиографию и

определение уровня общей фракции креатинфосфокиназы при биохимическом исследовании.

7. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс сердечно-сосудистой системы пациентам с врожденными и генетически обусловленными формами миопатий показано проведение суточного мониторирования ЭКГ и ЭхоКГ с доплеровским анализом.
8. Пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение широкого генетического обследования для установления этиологической причины заболевания и последующего каскадного скрининга членов семьи пробанда.
9. Для установления генетической причины заболевания пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение генетического тестирования методом массового параллельного секвенирования с использованием целевых панелей генов.
10. Для установления генетической причины заболевания у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии не показано использование секвенирования по методу Сенгера, а также проведение полноэкзомного секвенирования в качестве методов «первой линии» диагностического поиска.

**СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ**

АД	— артериальное давление
АДФ	— аденозиндифосфат
АКМП	— аритмогенная кардиомиопатия
АМКР	— антагонисты минералкортикоидных рецепторов
АРА	— антагонисты рецепторов к ангиотензину
АТФ	— аденозинтрифосфат
ВОЗ	— Всемирная организация здравоохранения
ВПС	— врожденный порок сердца
ВС	— внезапная смерть
ГКМП	— гипертрофическая кардиомиопатия
ГЛЖ	— гипертрофия левого желудочка
ДТТ	— дитиотреитол
ДА	— дискриминантный анализ
ДКМП	— дилатационная кардиомиопатия
ДМЖП	— дефекты межжелудочковой перегородки
ДМПП	— дефекты межпредсердной перегородки
ДМСО	— диметилсульфоксид
ДФ	— дискриминантная функция
ЖТ	— желудочковая тахикардия
ЖЭ	— желудочковая экстрасистолия
ЗСЛЖ	— задняя стенка левого желудочка
ИАПФ	— ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
ИБС	— ишемическая болезнь сердца
ИКД	— имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор
ИЛЖУ	— имплантируемое левожелудочковое устройство
ИМ	— инфаркт миокарда
ИММ	— индекс массы миокарда
ИМТ	— индекс массы тела

иПСК	— индуцированные плюрипотентные клетки
КДР	— конечно-диастолический размер
КМП	— кардиомиопатия
КМЦ	— кардиомиоцит
КОЕ	— колониеобразующая единица
КРТ	— кардиореспираторный тест
КСР	— конечно-систолический размер
КФК	— креатинфосфокиназа
ЛА	— легочная артерия
ЛДГ	— лактатдегидрогеназа
ЛЖ	— левый желудочек
ЛП	— левое предсердие
МАД	— мандибулоакральная дисплазия
МЖП	— межжелудочковая перегородка
ММСК	— мультипотентные мезенхимные стромальные клетки
МПТП	— митохондриальные поры транзитной проницаемости
МРТ	— магнитно-резонансная томография
НЛЖ	— некомпактный левый желудочек
НМЗ	— нейромышечные заболевания
НТГ	— нарушение толерантности к глюкозе
ОАП	— открытый артериальный проток
ОТ-ПЦР	— ПЦР с обратной транскрипцией
ПБЛНПГ	— полная блокада левой ножки пучка Гиса
ПФ	— промежуточные филаменты
ПФА	— параформальдегид
ПЦР	— полимеразная цепная реакция
РААС	— ренин-ангиотензин-альдостероновая система
РКМП	— рестриктивная кардиомиопатия
СД	— сахарный диабет
СКФ	— скорость клубочковой фильтрации

СН	—	сердечная недостаточность
СН-нФВ	—	сердечная недостаточность с низкой фракцией выброса
СН-пФВ	—	сердечная недостаточность с промежуточной фракцией выброса
СН-сФВ	—	сердечная недостаточность с сохранной фракцией выброса
ССС	—	синдром слабости синусового узла
ТС	—	трансплантация сердца
ТХУ	—	трихлоруксусная кислота
ФВ	—	фракция выброса
ФК	—	функциональный класс
ФП	—	фибриляция предсердий
ХОБЛ	—	хроническая обструктивная болезнь легких
ХСН	—	хроническая сердечная недостаточность
цАМФ	—	циклический аденозинмонофосфат
ЧСЛД	—	частичная семейная липодистрофия
ЧСС	—	частота сердечных сокращений
ЭГТА	—	этиленгликоль тетрауксусной кислоты
ЭКГ	—	электрокардиограмма
ЭМГ	—	электромиография
ЭхоКГ	—	эхокардиографическое исследование
ACMG	—	Americal Gollege of Medical Genetics (Американское общество медицинской генетики)
array-CGH	—	сравнительная геномная гибридизация
ASD	—	дефект межпредсердной перегородки (atrial septal defect)
AUC	—	area under the curve (площадь под кривой)
AV	—	атриовентрикулярная (блокада)
CI	—	доверительный интервал (confidential interval)
CIAP	—	щелочная фосфатаза из кишечника теленка
СmС	—	хлор-М-крезол (Chlormcresol)
EDMD2 и EDMD3	—	аутосомно-доминантная и аутосомно-рецессивная



	мышечная дистрофия Эмери–Дрейфуса 2-го и 3-го типа
ESC	— Европейское общество кардиологов (European society of Cardiology)
FCCP	— карбонилцианид-n-трифторметоксифенилгидразон
FCS	— телячья сыворотка
GAPDH	— глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
GFP	— зеленый флюоресцентный белок
Hb	— гемоглобин
HDAC	— гистоновые деацетилазы
LGMD1B	— конечно-поясная мышечная дистрофия тип 1B
LQTS	— синдром удлиненного интервала QT
MAF	— частота минорного аллеля (minor allele frequency)
MCU	— митохондриальный кальциевый транспортер (mitochondrial calcium uniporter)
MOI	— мультипликация инфекции/клеточных трансдукций
Nav1.5	— сердечный потенциалзависимый натриевый канал
NT-proBNP	— N-концевой участок мозгового натриуретического пептида
NYHA	— классификация по системе New York Heart Association
OR	— отношение шансов (odds ration)
PDA	— открытый артериальный проток (potent ductus arteriosus)
PEAK VO <sub>2</sub>	— максимальное потребление кислорода
SA	— синоатриальная (блокада)
SD	— стандартное отклонение (standard deviation)
SEM	— стандартная ошибка среднего (standard arrow of mean)
siRNA	— малые интерферирующие РНК
SNP	— единичный нуклеотидный полиморфизм (single nucleotide polymorphism)
VE/VCO <sub>2</sub>	— соотношение минутной вентиляции (VE) к VCO <sub>2</sub>

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бейшенкулов, М. Случай некомпактной кардиомиопатии / М.Т. Бейшенкулов, Д.А. Усупбаева, Т.Ш. Абдурашидова, [et al.] // Журнал сердечная недостаточность. —2016.—Т.17, №1.— с.69-72.
2. Благова, О. Первичная (генетически детерминированная) дилатационная кардиомиопатия у пациента с новой мутацией в гене ламина: клинико-морфологическая диагностика и лечение / О.В. Благова, И.Н.Н. Алиева, А.В. Сулимов, В.А., Е.А.Ш. Коган, А.Г., [et al.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика —2017.—Т.16, №4.— с.76-82.
3. Благова, О. Стратификация риска внезапной смерти и критерии отбора на имплантацию дефибрилляторов у больных с кардиомиопатиями (дилатационной, аритмогенной правожелудочковой, некомпактным миокардом) / О.В. Благова, Ю.А. Лутохина, Н.В. Вариончик, [et al.] // Клиническая и экспериментальная хирургия Журнал имени академика БВ Петровского. —2018.—Т.6, №3.— с.34-49.
4. Благова, О. Эффективность кардиовертеров-дефибрилляторов в профилактике внезапной смерти и снижении общей летальности у больных с синдромом дилатационной кардиомиопатии: дифференцированный подход / О.В. Благова, А.В. Недоступ, Е.В. Заклязьминская // Российский кардиологический журнал. —2018.—Т.23, №2.— с.67-79.
5. Благова, О. Трансплантация сердца как метод лечения прогрессирующей кардиомиопатии у больных с первичными миодистрофиями / О.В. Благова, А.В. Недоступ, В.П. Седов, [et al.] // Клиническая и экспериментальная хирургия Журнал имени академика БВ Петровского. —2017.—Т.5, №3.— с.34-48.
6. Вайханская, Т. Мультидисциплинарная и многосистемная проблема ламинопатий: болезней много - ген один / Т.Г. Вайханская, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Журнал сердечная недостаточность. —2016.—Т.17, №3.— с.201-11.
7. Вайханская, Т. Мутации гена ламина А/С (LMNA) у пациентов с дилатационной кардиомиопатией и их фенотипические проявления / Т.Г. Вайханская, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Евразийский кардиологический журнал —2016.—Т5.№1.— с.3-11.
8. Вайханская, Т. Орфанный фенотип кардиогенитальной ламинопатии – синдром Малуфа (краткий литературный обзор и клинический случай из практики) / Т.Г. Вайханская, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2016.—Т.21, №11.— с.90-94.
9. Вайханская, Т. Болезнь Данона: редко выявляемое системное заболевание с LAMP2-кардиомиопатией / Т.Г. Вайханская, Л.Н. Сивицкая, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2017.—Т.22, №10.— с.93-97.

10. Вершинина, Т. Рестриктивные кардиомиопатии у детей. Собственный опыт / Т.Л. Вершинина, И.Л. Никитина, Н.С. Беляева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. —2016.—Т.61, №3.— с.192-193.
11. Гайсёнок, О. Некомпактный миокард левого желудочка / О.В. Гайсёнок, П.А. Курносов, С.А. Бернс // Архив патологии. —2018.—Т.80, №4.— с.47-53.
12. Галагудза, М. Экспериментальные модели рестриктивной кардиомиопатии / М.М. Галагудза, А.А. Костарева // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. —2015.—Т.14, №3.— с.14-21.
13. Гудкова, А. Не Val30Met-транстиретиновая амилоидная кардиомиопатия. обзор сведений литературы и клиническое наблюдение / А.Я. Гудкова, А.А. Полякова, А.В. Амелин, [et al.] // Российский кардиологический журнал. — 2018.—Т.23, №2.— с.121-128.
14. Гудкова, А. Мутации и редкие варианты гена десмина в качестве причин развития различных вариантов кардиомиопатий / А.Я. Гудкова, Н.А. Смолина, Е.Н. Семернин, [et al.] // Трансляционная медицина. —2014.— Т5.№3.— с.62-72.
15. Затейщиков, Д. Полногеномные исследования в кардиологии: новый взгляд на патогенез или необходимость внедрения в практику / Д.А. Затейщиков, Л. Монсеррат, М. Арад // Кремлевская медицина Клинический вестник. — 2017.—Т3.№1.— с.6-12.
16. Каплунова, В. Гипертрофическая кардиомиопатия: формы и варианты течения, подходы к фармакотерапии / В.Ю. Каплунова, Г.А. Шакарьянц, М.В. Кожевникова, [et al.] // Клиническая медицина. —2017.—Т.95, №12.— с.1061-1069.
17. Комиссарова, С. Гипертрофическая кардиомиопатия: анализ связи генотипа и фенотипа у пациентов с высоким риском внезапной смерти / С.М. Комиссарова, Н.Н. Чакова, С.С. Ниязова // Медицинская генетика. —2018.— Т.17, №11.— с.34-42.
18. Комиссарова, С. Особенности клинических проявлений гипертрофической кардиомиопатии у пациентов с различными мутациями в генах саркомеров / С.М. Комиссарова, Н.Н. Чакова, С.С. Ниязова, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2016.—Т.21, №1.— с.20-25.
19. Копишинская, С. Транстиретиновая семейная амилоидная полинейропатия / С.В. Копишинская // Журнал неврологии и психиатрии им СС Корсакова. — 2018.—Т.118, №10.— с.82-89.
20. Костарева, А. Генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии / А.А. Костарева, А.Я. Гудкова, Т.М. Первунина, [et al.] // Кремлевская медицина Клинический вестник. —2017.—Т.8, №1.— с.39-46.
21. Костарева, А. Генетические варианты кардиомиопатий с нейромышечным фенотипом / А.А. Костарева, Т.М. Первунина, О.М. Моисеева, [et al.] // Журнал сердечная недостаточность. —2016.—Т.17, №4.— с.278-86.
22. Крылова, Н. Внезапная смерть при гипертрофической кардиомиопатии: поиск новых факторов риска / Н.С. Крылова, Е.А. Ковалевская, Н.Г. Потешкина, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2017.—Т.22, №2.— с.62-67.

23. Куликова, О. Некомпактная кардиомиопатия левого желудочка - клиническая и генетическая характеристика / О.В. Куликова, Р.П. Мясников, А.Н. Мешков, [et al.] // Кардиологический вестник. —2018.—Т.13, №2.— с.26-31.
24. Курушко, Т. Ламин А/С ассоциированная дилатационная кардиомиопатия: вариабельность клинических проявлений / Т.В. Курушко, Т.Г. Вайханская, А.Г. Булгак, [et al.] // Кардиология в Беларуси. —2018.—Т.9, №6.— с.892-903.
25. Леонтьева, И. Кардиомиопатии при врожденных нарушениях метаболизма у детей / И.В. Леонтьева, Е.А. Николаева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. —2016.—Т.61, №2.— с.17-27.
26. Леонтьева, И. Поражение сердца при синдроме Барта / И.В. Леонтьева, Е.А. Николаева, Е.П. Калачанова // Российский вестник перинатологии и педиатрии. —2016.—Т.61, №1.— с.64-70.
27. Малашичева, А. Мутации в гене ламина А/С изменяют дифференцировочный потенциал стромальных клеток жировой ткани / А.Б. Малашичева, А.С. Забирник, Н.А. Смолина, [et al.] // Цитология. —2013.—Т.55, №5.— с.313-7.
28. Мельник, О. Клинический полиморфизм расопатий в условиях детского кардиологического отделения / О.В. Мельник, А.Я. Гудкова, Т.Л. Вершинина, [et al.] // Consilium Medicum. —2017.—Т.2017, №19.— с.12.
29. Мельник, О. Филаминовая рестриктивная кардиомиопатия: о чём следует знать / О.В. Мельник, А.А. Князева, О.Ю. Полубояринова, [et al.] // Трансляционная медицина. —2018.—Т.5, №3.— с.15-22.
30. Мельник, О. Синдром Барта в практике кардиолога / О.В. Мельник, Т.С. Лоевец, Т.Л. Вершинина, [et al.] // Российский кардиологический журнал. — 2018.—Т.23, №3.— с.54-59.
31. Миннихметова, К. Клинико-генетические аспекты кардиомиопатий / К.И. Миннихметова, Р.И. Хусаинова, И.Е. Николаева, [et al.] // Медицинская генетика. —2018.—Т.17, №12.— с.3-13.
32. Мясников, Р. Мутация гена DES в семье пробанда с миофибриллярной миопатией и развитием некомпактной кардиомиопатии, приведшей к трансплантации сердца / Р.П. Мясников, Н.В. Щербакова, О.В. Куликова, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2017.—Т.10, №10.— с.9-16.
33. Павленко, Е. Регистр взрослых больных с некомпактным миокардом левого желудочка: классификация клинических форм и проспективная оценка их прогрессирования / Е.В. Павленко, О.В. Благова, Н.В. Вариончик, [et al.] // Российский кардиологический журнал. —2019.—Т.24, №2.— с.12-25.
34. Перепепина, К. Влияние мутаций в гене LMNA на миогенную дифференцировку первичных сателлитных клеток и клеток линии C2C12 / К.И. Перепепина, Н.А. Смолина, А.С. Забирник, [et al.] // Цитология. — 2017.—Т.59, №2.— с.117-24.
35. Позднякова, Н. Диагностические критерии электрической нестабильности миокарда при дилатационной кардиомиопатии / Н.В. Позднякова, А.Г. Денисова, И.П. Татарченко, [et al.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. —2019.—Т.18, №S1.— с.121-122.

36. Полякова, А. Ассоциация полиморфных вариантов генов MADD и MYH7 и гипертрофической кардиомиопатии у пациентов старше 45 лет / А.А. Полякова, В.Г. Давыдова, А.А. Стрельцова, [et al.] // Кремлевская медицина Клинический вестник. —2017.—Т.2, №1.— с.47-54.
37. Попова, Е. Клинические особенности поражения сердца при генерализованном саркоидозе / Е.Н. Попова, Л.А. Стрижаков, В.И. Шоломова, [et al.] // Терапевтический архив. —2018.—Vol.90, №1.— P.54-9.
38. Рыбакова, М. Десминовая кардиомиопатия / М.Г. Рыбакова, И.А. Кузнецова, А.Я. Гудкова, [et al.] // Архив патологии. —2011.—Т.73, №4.— с.56-9.
39. Рыжкова, О. Руководство по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования (mps) / О.П. Рыжкова, О.Л. Кардымон, Е.Б. Прохорчук, [et al.] // Медицинская генетика. —2017.—Т.16, №7.— с.4-17.
40. Сдвигова, Н. Актуальность генетической верификации некомпактной кардиомиопатии у детей: клинические случаи / Н.А. Сдвигова, Е.Н. Басаргина, Д.В. Рябцев, [et al.] // Вопросы современной педиатрии. —2018.— Т.17, №2.— с.157-165.
41. Сивицкая, Л. Клинический случай поздней диагностики мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса, ассоциированной с мутацией в гене LMNA / Л.Н. Сивицкая, Т.Г. Вайханская, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Медицинская генетика. —2016.—Т.15, №8.— с.33-5.
42. Сивицкая, Л. Синдром Данона: совокупный анализ данных таргетного NGS и клиники (первый опыт диагностики в Беларуси / Л.Н. Сивицкая, Т.Г. Вайханская, Н.Г. Даниленко, [et al.] // Медицинская генетика. —2018.—Т.17, №4.— с.47-9.
43. Сивицкая, Л. Семейный случай дилатационной кардиомиопатии, ассоциированной с мутацией в гене фактора сплайсинга RBM20 / Л.Н. Сивицкая, Т.Г. Вайханская, О.Д. Левданский, [et al.] // Медицинская генетика. —2018.—Т.17, №11.— с.48-52.
44. Симоненко, М. Опыт трансплантации сердца у детей в северо-западном федеральном округе российской федерации / М.А. Симоненко, Т.М. Первунина, П.А. Федотов, [et al.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. —2018.—Т.20, №2.— с.37-46.
45. Стрельцова, А. Фибрилляция предсердий при гипертрофической кардиомиопатии: современные аспекты эпидемиологии, факторов риска, патогенеза и фармакотерапии / А.А. Стрельцова, А.Я. Гудкова, А.А. Костарева // Consilium Medicum. —2018.—Т.20, №5.— с.34-9.
46. Суркова, Е. Наследственные кардиомиопатии. Современные методы генетической диагностики / Е.И. Суркова, О.С. Чумакова, А.Г. Никитин, [et al.] // Молекулярная медицина. —2019.—Т.19, №1.— с.19-24.
47. Третьяков, А. Клиническое наблюдение сочетания диффузного альвеолярно-септального варианта поражения легких и амилоидной кардиомиопатии при системном AL-амилоидозе в пожилом возрасте / А.Ю. Третьяков, С.П. Захарченко, В.А. Третьякова, [et al.] // Терапевтический архив. —2018.— Т.90, №12.— с.96-100.

48. Умарова, М. Некомпактный миокард левого желудочка у детей: клинические проявления и прогноз / М.К. Умарова, Е.Н. Басаргина, И.Е. Смирнов // Российский педиатрический журнал. —2016.—Т.19, №3.— с.174-82.
49. Харлап, М. Практическое значение генетической диагностики при наследственных заболеваниях, проявляющихся злокачественными нарушениями ритма сердца / М.С. Харлап, Н.А. Соничева // Вестник аритмологии. —2016.—Т.86, №5.— с.57-71
50. Хван, Д. Применение бивентрикулярного устройства вспомогательного кровообращения "BERLIN HEART EXCOR" в качестве моста к трансплантации сердца пациенту с дилатационной кардиомиопатией / Д.С. Хван, А.М. Чернявский, В.У. Эфендиев, [et al.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. —2018.—Т.20, №2.— с.69-73.
51. Худяков, А. Внеклеточные микрорнк и митохондриальная днк как потенциальные биомаркеры аритмогенной кардиомиопатии / А.А. Худяков, Н.А. Смолина, К.И. Перепелина, [et al.] // Биохимия —2019.—Т.84, №3.— с.392-403.
52. Aaronso, K. Development and prospective validation of a clinical index to predict survival in ambulatory patients referred for cardiac transplant evaluation / K.D. Aaronso, J.S. Schwartz, T.M. Chen, [et al.] // Circulation. —1997.—Vol.95, №12.— P.2660-7.
53. Abilez, O. Passive Stretch Induces Structural and Functional Maturation of Engineered Heart Muscle as Predicted by Computational Modeling / O.J. Abilez, E. Tzatzalos, H. Yang, [et al.] // Stem Cells. —2018.—Vol.36, №2.— P.265-77.
54. Aebi, U. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments / U. Aebi, J. Cohn, L. Buhle, [et al.] // Nature. —1986.—Vol.323, №6088.— P.560-4.
55. Agostoni, P. Metabolic exercise test data combined with cardiac and kidney indexes, the MECKI score: a multiparametric approach to heart failure prognosis / P. Agostoni, U. Corra, G. Cattadori, [et al.] // Int J Cardiol. —2013.—Vol.167, №6.— P.2710-8.
56. Agostoni, P. Multiparametric prognostic scores in chronic heart failure with reduced ejection fraction: a long-term comparison / P. Agostoni, S. Paolillo, M. Mapelli, [et al.] // Eur J Heart Fail. —2018.—Vol.20, №4.— P.700-10.
57. 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.
58. Akter, R. Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function / R. Akter, D. Rivas, G. Geneau, [et al.] // J Bone Miner Res. —2009.— Vol.24, №2.— P.283-93.
59. Alam, S. Aberrant Mitochondrial Fission Is Maladaptive in Desmin Mutation-Induced Cardiac Proteotoxicity / S. Alam, C.S. Abdullah, R. Aishwarya, [et al.] // J Am Heart Assoc. —2018.—Vol.7, №14.— P.
60. Albers, K. The molecular biology of intermediate filament proteins / K. Albers, E. Fuchs // Int Rev Cytol. —1992.—Vol.134, 243-79.

61. Ammash, N. Clinical profile and outcome of idiopathic restrictive cardiomyopathy / N.M. Ammash, J.B. Seward, K.R. Bailey, [et al.] // *Circulation*. —2000.—Vol.101, №21.— P.2490-6.
62. Araujo-Vilar, D. A novel phenotypic expression associated with a new mutation in LMNA gene, characterized by partial lipodystrophy, insulin resistance, aortic stenosis and hypertrophic cardiomyopathy / D. Araujo-Vilar, J. Lado-Abeal, F. Palos-Paz, [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)*. —2008.—Vol.69, №1.— P.61-8.
63. Arbustini, E. Desmin accumulation restrictive cardiomyopathy and atrioventricular block associated with desmin gene defects / E. Arbustini, M. Pasotti, A. Pilotto, [et al.] // *Eur J Heart Fail*. —2006.—Vol.8, №5.— P.477-83.
64. Ariza, A. Desmin myopathy: a multisystem disorder involving skeletal, cardiac, and smooth muscle / A. Ariza, J. Coll, M.T. Fernandez-Figueras, [et al.] // *Hum Pathol*. —1995.—Vol.26, №9.— P.1032-7.
65. Arzilli, C. N-terminal fraction of pro-B-type natriuretic peptide versus clinical risk scores for prognostic stratification in chronic systolic heart failure / C. Arzilli, A. Aimo, G. Vergaro, [et al.] // *Eur J Prev Cardiol*. —2018.—Vol.25, №8.— P.889-95.
66. Ashbrook, D. A cross-species genetic analysis identifies candidate genes for mouse anxiety and human bipolar disorder / D.G. Ashbrook, R.W. Williams, L. Lu, [et al.] // *Front Behav Neurosci*. —2015.—Vol.9, 171.
67. Ashrafian, H. Disease pathways and novel therapeutic targets in hypertrophic cardiomyopathy / H. Ashrafian, W.J. McKenna, H. Watkins // *Circ Res*. —2011.—Vol.109, №1.— P.86-96.
68. Babu, A. Determination of residue specificity in the EF-hand of troponin C for Ca<sup>2+</sup> coordination, by genetic engineering / A. Babu, H. Su, Y. Ryu, [et al.] // *J Biol Chem*. —1992.—Vol.267, №22.— P.15469-74.
69. Balaban, R. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium / R.S. Balaban // *J Mol Cell Cardiol*. —2002.—Vol.34, №10.— P.1259-71.
70. Bar, H. Forced expression of desmin and desmin mutants in cultured cells: impact of myopathic missense mutations in the central coiled-coil domain on network formation / H. Bar, A. Kostareva, G. Sjoberg, [et al.] // *Exp Cell Res*. —2006.—Vol.312, №9.— P.1554-65.
71. Bar, H. Severe muscle disease-causing desmin mutations interfere with in vitro filament assembly at distinct stages / H. Bar, N. Mucke, A. Kostareva, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. —2005.—Vol.102, №42.— P.15099-104.
72. Bar, H. Impact of disease mutations on the desmin filament assembly process / H. Bar, N. Mucke, P. Ringler, [et al.] // *J Mol Biol*. —2006.—Vol.360, №5.— P.1031-42.
73. Begay, R. FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy / R.L. Begay, C.A. Tharp, A. Martin, [et al.] // *JACC Basic Transl Sci*. —2016.—Vol.1, №5.— P.344-59.
74. 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. Bollen, T.B. Rasmussen, [et al.] // *Cardiovasc Res*. —2016.—Vol.112, №1.— P.452-63.

75. Bernardi, P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition / P. Bernardi // *Physiol Rev.* —1999.—Vol.79, №4.— P.1127-55.
76. Bertini, E. Cardiomyopathy and multicore myopathy with accumulation of intermediate filaments / E. Bertini, C. Bosman, M. Bevilacqua, [et al.] // *Eur J Pediatr.* —1990.—Vol.149, №12.— P.856-8.
77. Bertini, E. Neuromyopathy and restrictive cardiomyopathy with accumulation of intermediate filaments: a clinical, morphological and biochemical study / E. Bertini, C. Bosman, E. Ricci, [et al.] // *Acta Neuropathol.* —1991.—Vol.81, №6.— P.632-40.
78. Bevacqua, B. Epidural blood patch in a patient with HIV infection / B.K. Bevacqua, A.V. Slucky // *Anesthesiology.* —1991.—Vol.74, №5.— P.952-3.
79. Bhuiyan, M. In vivo definition of cardiac myosin-binding protein C's critical interactions with myosin / M.S. Bhuiyan, P. McLendon, J. James, [et al.] // *Pflugers Arch.* —2016.—Vol.468, №10.— P.1685-95.
80. Bi, W. MADD promotes the survival of human lung adenocarcinoma cells by inhibiting apoptosis / W. Bi, Y. Wei, J. Wu, [et al.] // *Oncol Rep.* —2013.—Vol.29, №4.— P.1533-9.
81. Bleumink, G. Genetic polymorphisms and heart failure / G.S. Bleumink, A.F. Schut, M.C. Sturkenboom, [et al.] // *Genet Med.* —2004.—Vol.6, №6.— P.465-74.
82. Boguslavsky, R. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy / R.L. Boguslavsky, C.L. Stewart, H.J. Worman // *Hum Mol Genet.* —2006.—Vol.15, №4.— P.653-63.
83. Bos, J. 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.] // *Mol Genet Metab.* —2006.—Vol.88, №1.— P.78-85.
84. Brauch, K. Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy / K.M. Brauch, M.L. Karst, K.J. Herron, [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* —2009.—Vol.54, №10.— P.930-41.
85. Brodehl, A. Mutations in FLNC are Associated with Familial Restrictive Cardiomyopathy / A. Brodehl, R.A. Ferrier, S.J. Hamilton, [et al.] // *Hum Mutat.* —2016.—Vol.37, №3.— P.269-79.
86. Brodehl, A. The novel alphaB-crystallin (CRYAB) mutation p.D109G causes restrictive cardiomyopathy / A. Brodehl, A. Gaertner-Rommel, B. Klauke, [et al.] // *Hum Mutat.* —2017.—Vol.38, №8.— P.947-52.
87. Burridge, P. Chemically defined generation of human cardiomyocytes / P.W. Burridge, E. Matsu, P. Shukla, [et al.] // *Nat Methods.* —2014.—Vol.11, №8.— P.855-60.
88. Cadot, B. Nuclear movement during myotube formation is microtubule and dynein dependent and is regulated by Cdc42, Par6 and Par3 / B. Cadot, V. Gache, E. Vasyutina, [et al.] // *EMBO Rep.* —2012.—Vol.13, №8.— P.741-9.
89. Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function / Y. Capetanaki // *Trends Cardiovasc Med.* —2002.—Vol.12, №8.— P.339-48.



90. Capetanaki, Y. Muscle intermediate filaments and their links to membranes and membranous organelles / Y. Capetanaki, R.J. Bloch, A. Kouloumenta, [et al.] // *Exp Cell Res.* —2007.—Vol.313, №10.— P.2063-76.
91. Capetanaki, Y. Desmin cytoskeleton in muscle integrity and function / Y. Capetanaki, D.J. Milner // *Subcell Biochem.* —1998.—Vol.31, 463-95.
92. Cappola, T. Common variants in HSPB7 and FRMD4B associated with advanced heart failure / T.P. Cappola, M. Li, J. He, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* — 2010.—Vol.3, №2.— P.147-54.
93. Carlsson, L. Cytoskeletal derangements in hereditary myopathy with a desmin L345P mutation / L. Carlsson, C. Fischer, G. Sjöberg, [et al.] // *Acta Neuropathol.* —2002.—Vol.104, №5.— P.493-504.
94. Chang, A. Troponin and cardiomyopathy / A.N. Chang, M.S. Parvatiyar, J.D. Potter // *Biochem Biophys Res Commun.* —2008.—Vol.369, №1.— P.74-81.
95. Chang, L. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk / L. Chang, R.D. Goldman // *Nat Rev Mol Cell Biol.* —2004.—Vol.5, №8.— P.601-13.
96. Chauveau, C. A rising titan: TTN review and mutation update / C. Chauveau, J. Rowell, A. Ferreira // *Hum Mutat.* —2014.—Vol.35, №9.— P.1046-59.
97. Chen, J. Mutation in the caveolin-3 gene causes asymmetrical distal myopathy / J. Chen, W. Zeng, C. Han, [et al.] // *Neuropathology.* —2016.—Vol.36, №5.— P.485-9.
98. Chen, X. GWA study data mining and independent replication identify cardiomyopathy-associated 5 (CMYA5) as a risk gene for schizophrenia / X. Chen, G. Lee, B.S. Maher, [et al.] // *Mol Psychiatry.* —2011.—Vol.16, №11.— P.1117-29.
99. Chen, Y. Pediatric restrictive cardiomyopathy due to a heterozygous mutation of the TNNI3 gene / Y. Chen, S. Yang, J. Li, [et al.] // *J Biomed Res.* —2014.— Vol.28, №1.— P.59-63.
100. Christodoulou, D. 5'RNA-Seq identifies Fhl1 as a genetic modifier in cardiomyopathy / D.C. Christodoulou, H. Wakimoto, K. Onoue, [et al.] // *J Clin Invest.* —2014.—Vol.124, №3.— P.1364-70.
101. Cioffi, G. Reasons why patients suffering from chronic heart failure at very high risk for death survive / G. Cioffi, G. Pulignano, G. Barbatì, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2014.—Vol.177, №1.— P.213-8.
102. Cohen, T. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of Lap2alpha / T.V. Cohen, V.F. Gnocchi, J.E. Cohen, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —2013.—Vol.22, №14.— P.2852-69.
103. Contreras, L. Mitochondria: the calcium connection / L. Contreras, I. Drago, E. Zampese, [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* —2010.—Vol.1797, №6-7.— P.607-18.
104. Cornes, B. Association of levels of fasting glucose and insulin with rare variants at the chromosome 11p11.2-MADD locus: Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium Targeted Sequencing Study / B.K. Cornes, J.A. Brody, N. Nikpoor, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2014.— Vol.7, №3.— P.374-82.

105. Corrado, D. Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: an international task force consensus statement / D. Corrado, T. Wichter, M.S. Link, [et al.] // *Eur Heart J.* —2015.—Vol.36, №46.— P.3227-37.
106. Craig, R. Structure, sarcomeric organization, and thin filament binding of cardiac myosin-binding protein-C / R. Craig, K.H. Lee, J.Y. Mun, [et al.] // *Pflugers Arch.* —2014.—Vol.466, №3.— P.425-31.
107. Dagvadorj, A. Respiratory insufficiency in desminopathy patients caused by introduction of proline residues in desmin c-terminal alpha-helical segment / A. Dagvadorj, B. Goudeau, D. Hilton-Jones, [et al.] // *Muscle Nerve.* —2003.— Vol.27, №6.— P.669-75.
108. Davis, J. Allele and species dependent contractile defects by restrictive and hypertrophic cardiomyopathy-linked troponin I mutants / J. Davis, H. Wen, T. Edwards, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2008.—Vol.44, №5.— P.891-904.
109. de Tombe, P. Integration of cardiac myofilament activity and regulation with pathways signaling hypertrophy and failure / P.P. de Tombe, R.J. Solaro // *Ann Biomed Eng.* —2000.—Vol.28, №8.— P.991-1001.
110. Dechat, T. Nuclear lamins / T. Dechat, S.A. Adam, P. Taimen, [et al.] // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* —2010.—Vol.2, №11.— P.a000547.
111. Dechat, T. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin / T. Dechat, K. Pfliegerhaer, K. Sengupta, [et al.] // *Genes Dev.* —2008.—Vol.22, №7.— P.832-53.
112. Deng, Y. Phosphorylation of human cardiac troponin I G203S and K206Q linked to familial hypertrophic cardiomyopathy affects actomyosin interaction in different ways / Y. Deng, A. Schmidtman, S. Kruse, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* — 2003.—Vol.35, №11.— P.1365-74.
113. Deng, Y. Effects of phosphorylation and mutation R145G on human cardiac troponin I function / Y. Deng, A. Schmidtman, A. Redlich, [et al.] // *Biochemistry.* —2001.—Vol.40, №48.— P.14593-602.
114. Di Molfetta, A. The Use of Berlin Heart EXCOR VAD in Children Less than 10 kg: A Single Center Experience / A. Di Molfetta, F. Gandolfo, S. Filippelli, [et al.] // *Front Physiol.* —2016.—Vol.7, 614.
115. Ding, W. Role of Whole-exome Sequencing in Phenotype Classification and Clinical Treatment of Pediatric Restrictive Cardiomyopathy / W.H. Ding, L. Han, Y.Y. Xiao, [et al.] // *Chin Med J (Engl).* —2017.—Vol.130, №23.— P.2823-8.
116. Diokmetzidou, A. Desmin and alphaB-crystallin interplay in the maintenance of mitochondrial homeostasis and cardiomyocyte survival / A. Diokmetzidou, E. Soumaka, I. Kloukina, [et al.] // *J Cell Sci.* —2016.—Vol.129, №20.— P.3705-20.
117. Dmitrieva, R. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities / R.I. Dmitrieva, I.R. Minullina, A.A. Bilibina, [et al.] // *Cell Cycle.* —2012.—Vol.11, №2.— P.377-83.
118. Dominguez, F. Dilated Cardiomyopathy Due to BLC2-Associated Athanogene 3 (BAG3) Mutations / F. Dominguez, S. Cuenca, Z. Bilinska, [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* —2018.—Vol.72, №20.— P.2471-81.

119. Doolan, A. Cardiac troponin I mutations in Australian families with hypertrophic cardiomyopathy: clinical, genetic and functional consequences / A. Doolan, M. Tebo, J. Ingles, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2005.—Vol.38, №2.— P.387-93.
120. Durham, J. Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein / J.T. Durham, O.M. Brand, M. Arnold, [et al.] // *J Biol Chem.* —2006.—Vol.281, №10.— P.6841-9.
121. Dyer, E. Functional analysis of a unique troponin c mutation, GLY159ASP, that causes familial dilated cardiomyopathy, studied in explanted heart muscle / E.C. Dyer, A.M. Jacques, A.C. Hoskins, [et al.] // *Circ Heart Fail.* —2009.—Vol.2, №5.— P.456-64.
122. Edstrom, L. A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (skeletal) filaments / L. Edstrom, L.E. Thornell, A. Eriksson // *J Neurol Sci.* —1980.—Vol.47, №2.— P.171-90.
123. Ehler, E. Cardiomyocyte cytoskeleton and myofibrillogenesis in healthy and diseased heart / E. Ehler, J.C. Perriard // *Heart Fail Rev.* —2000.—Vol.5, №3.— P.259-69.
124. Ehsan, M. When signalling goes wrong: pathogenic variants in structural and signalling proteins causing cardiomyopathies / M. Ehsan, H. Jiang, L.T. K, [et al.] // *J Muscle Res Cell Motil.* —2017.—Vol.38, №3-4.— P.303-16.
125. Elliott, K. Altered regulatory properties of human cardiac troponin I mutants that cause hypertrophic cardiomyopathy / K. Elliott, H. Watkins, C.S. Redwood // *J Biol Chem.* —2000.—Vol.275, №29.— P.22069-74.
126. 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.] // *Eur Heart J.* —2008.—Vol.29, №2.— P.270-6.
127. Fardeau, M. [A new familial muscular disorder demonstrated by the intra-sarcoplasmic accumulation of a granulo-filamentous material which is dense on electron microscopy (author's transl)] / M. Fardeau, J. Godet-Guillain, F.M. Tome, [et al.] // *Rev Neurol (Paris).* —1978.—Vol.134, №6-7.— P.411-25.
128. Favreau, C. Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts / C. Favreau, D. Higuier, J.C. Courvalin, [et al.] // *Mol Cell Biol.* —2004.—Vol.24, №4.— P.1481-92.
129. Feng, J. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy / J. Feng, J. Yan, C.H. Buzin, [et al.] // *Mol Genet Metab.* —2002.—Vol.77, №1-2.— P.119-26.
130. Forleo, C. Clinical and functional characterization of a novel mutation in lamin a/c gene in a multigenerational family with arrhythmogenic cardiac laminopathy / C. Forleo, M. Carosino, N. Resta, [et al.] // *PLoS One.* —2015.—Vol.10, №4.— P.e0121723.
131. Frank, D. Role of the sarcomeric Z-disc in the pathogenesis of cardiomyopathy / D. Frank, C. Kuhn, H.A. Katus, [et al.] // *Future Cardiol.* —2007.—Vol.3, №6.— P.611-22.

132. Franke, J. Etiology-specific assessment of predictors of long-term survival in chronic systolic heart failure / J. Franke, C. Zugck, M. Hochadel, [et al.] // *Int J Cardiol Heart Vasc.* —2015.—Vol.7, 61-8.
133. Franssen, C. The role of titin and extracellular matrix remodelling in heart failure with preserved ejection fraction / C. Franssen, A. Gonzalez Miqueo // *Neth Heart J.* —2016.—Vol.24, №4.— P.259-67.
134. Freitas, P. Comparative Analysis of Four Scores to Stratify Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction / P. Freitas, C. Aguiar, A. Ferreira, [et al.] // *Am J Cardiol.* —2017.—Vol.120, №3.— P.443-9.
135. Frey, N. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress / N. Frey, T. Barrientos, J.M. Shelton, [et al.] // *Nat Med.* —2004.—Vol.10, №12.— P.1336-43.
136. Frock, R. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation / R.L. Frock, B.A. Kudlow, A.M. Evans, [et al.] // *Genes Dev.* —2006.—Vol.20, №4.— P.486-500.
137. Fuchs, E. Intermediate filaments and disease: mutations that cripple cell strength / E. Fuchs // *J Cell Biol.* —1994.—Vol.125, №3.— P.511-6.
138. Furukawa, M. An association analysis of the cardiomyopathy-associated 5 (CMYA5) gene with schizophrenia in a Japanese population / M. Furukawa, M. Tochigi, T. Otowa, [et al.] // *Psychiatr Genet.* —2013.—Vol.23, №4.— P.179-80.
139. Gallego-Delgado, M. Idiopathic Restrictive Cardiomyopathy Is Primarily a Genetic Disease / M. Gallego-Delgado, J.F. Delgado, V. Brossa-Loidi, [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* —2016.—Vol.67, №25.— P.3021-3.
140. Gallego-Delgado, M. Adverse clinical course and poor prognosis of hypertrophic cardiomyopathy due to mutations in FHL1 / M. Gallego-Delgado, E. Gonzalez-Lopez, L. Garcia-Guereta, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2015.—Vol.191, 194-7.
141. Gambarin, F. Pure restrictive cardiomyopathy associated with cardiac troponin I gene mutation: mismatch between the lack of hypertrophy and the presence of disarray / F.I. Gambarin, M. Tagliani, E. Arbustini // *Heart.* —2008.—Vol.94, №10.— P.1257.
142. Garg, L. Atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, clinical impact, and management / L. Garg, M. Gupta, S.R.A. Sabzwari, [et al.] // *Heart Fail Rev.* —2019.—Vol.24, №2.— P.189-97.
143. Gerull, B. The Rapidly Evolving Role of Titin in Cardiac Physiology and Cardiomyopathy / B. Gerull // *Can J Cardiol.* —2015.—Vol.31, №11.— P.1351-9.
144. Ghaoui, R. Use of Whole-Exome Sequencing for Diagnosis of Limb-Girdle Muscular Dystrophy: Outcomes and Lessons Learned / R. Ghaoui, S.T. Cooper, M. Lek, [et al.] // *JAMA Neurol.* —2015.—Vol.72, №12.— P.1424-32.
145. Girolami, F. Novel alpha-actinin 2 variant associated with familial hypertrophic cardiomyopathy and juvenile atrial arrhythmias: a massively parallel sequencing study / F. Girolami, M. Iascone, B. Tomberli, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2014.—Vol.7, №6.— P.741-50.

146. Goda, A. Selecting patients for heart transplantation: comparison of the Heart Failure Survival Score (HFSS) and the Seattle heart failure model (SHFM) / A. Goda, P. Williams, D. Mancini, [et al.] // *J Heart Lung Transplant*. —2011.— Vol.30, №11.— P.1236-43.
147. Golbus, J. Population-based variation in cardiomyopathy genes / J.R. Golbus, M.J. Puckelwartz, J.P. Fahrenbach, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet*. —2012.—Vol.5, №4.— P.391-9.
148. Goldfarb, L. Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy / L.G. Goldfarb, K.Y. Park, L. Cervenakova, [et al.] // *Nat Genet*. —1998.—Vol.19, №4.— P.402-3.
149. Goldfarb, L. Desmin myopathy / L.G. Goldfarb, P. Vicart, H.H. Goebel, [et al.] // *Brain*. —2004.—Vol.127, №Pt 4.— P.723-34.
150. Gomes, A. Cellular and molecular aspects of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin I gene / A.V. Gomes, J.D. Potter // *Mol Cell Biochem*. —2004.—Vol.263, №1-2.— P.99-114.
151. Gomez, J. Screening of the Filamin C Gene in a Large Cohort of Hypertrophic Cardiomyopathy Patients / J. Gomez, R. Lorca, J.R. Reguero, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet*. —2017.—Vol.10, №2.— P.
152. Gramlich, M. Antisense-mediated exon skipping: a therapeutic strategy for titin-based dilated cardiomyopathy / M. Gramlich, L.S. Pane, Q. Zhou, [et al.] // *EMBO Mol Med*. —2015.—Vol.7, №5.— P.562-76.
153. Graw, J. Genetics of crystallins: cataract and beyond / J. Graw // *Exp Eye Res*. —2009.—Vol.88, №2.— P.173-89.
154. Greenway, S. Sudden death in an infant with angina, restrictive cardiomyopathy, and coronary artery bridging: an unusual phenotype for a beta-myosin heavy chain (MYH7) sarcomeric protein mutation / S.C. Greenway, G.J. Wilson, J. Wilson, [et al.] // *Circ Heart Fail*. —2012.—Vol.5, №6.— P.e92-3.
155. Gruen, M. cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion / M. Gruen, H. Prinz, M. Gautel // *FEBS Lett*. —1999.—Vol.453, №3.— P.254-9.
156. Grupper, A. Role of ventricular assist therapy for patients with heart failure and restrictive physiology: Improving outcomes for a lethal disease / A. Grupper, S.J. Park, N.L. Pereira, [et al.] // *J Heart Lung Transplant*. —2015.—Vol.34, №8.— P.1042-9.
157. Gudkova, A. Diagnostic challenge in desmin cardiomyopathy with transformation of clinical phenotypes / A. Gudkova, A. Kostareva, G. Sjoberg, [et al.] // *Pediatr Cardiol*. —2013.—Vol.34, №2.— P.467-70.
158. Guo, W. RBM20, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing / W. Guo, S. Schafer, M.L. Greaser, [et al.] // *Nat Med*. —2012.—Vol.18, №5.— P.766-73.
159. Guttmann, O. Predictors of atrial fibrillation in hypertrophic cardiomyopathy / O.P. Guttmann, M. Pavlou, C. O'Mahony, [et al.] // *Heart*. —2017.—Vol.103, №9.— P.672-8.
160. Guzun, R. Regulation of respiration in muscle cells in vivo by VDAC through interaction with the cytoskeleton and MtCK within Mitochondrial Interactosome /

- R. Guzun, M. Gonzalez-Granillo, M. Karu-Varikmaa, [et al.] // *Biochim Biophys Acta*. —2012.—Vol.1818, №6.— P.1545-54.
161. Haas, J. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy / J. Haas, K.S. Frese, B. Peil, [et al.] // *Eur Heart J*. —2015.—Vol.36, №18.— P.1123-35a.
  162. Hakelien, A. Expression of the myodystrophic R453W mutation of lamin A in C2C12 myoblasts causes promoter-specific and global epigenetic defects / A.M. Hakelien, E. Delbarre, K.G. Gaustad, [et al.] // *Exp Cell Res*. —2008.—Vol.314, №8.— P.1869-80.
  163. Hakim, C. AAV CRISPR editing rescues cardiac and muscle function for 18 months in dystrophic mice / C.H. Hakim, N.B. Wasala, C.E. Nelson, [et al.] // *JCI Insight*. —2018.—Vol.3, №23.— P.
  164. 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. Lourenco, [et al.] // *Circ Heart Fail*. —2013.—Vol.6, №6.— P.1239-49.
  165. Hamdani, N. Crucial role for Ca<sup>2+</sup>/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.] // *Circ Res*. —2013.—Vol.112, №4.— P.664-74.
  166. Hamdani, N. Distinct myocardial effects of beta-blocker therapy in heart failure with normal and reduced left ventricular ejection fraction / N. Hamdani, W.J. Paulus, L. van Heerebeek, [et al.] // *Eur Heart J*. —2009.—Vol.30, №15.— P.1863-72.
  167. Han, S. Association between CMYA5 gene polymorphisms and risk of schizophrenia in Uygur population and a meta-analysis / S. Han, Z. An, X. Luo, [et al.] // *Early Interv Psychiatry*. —2018.—Vol.12, №1.— P.15-21.
  168. Hanke, S. Left ventricular noncompaction cardiomyopathy in Barth syndrome: an example of an undulating cardiac phenotype necessitating mechanical circulatory support as a bridge to transplantation / S.P. Hanke, A.B. Gardner, J.P. Lombardi, [et al.] // *Pediatr Cardiol*. —2012.—Vol.33, №8.— P.1430-4.
  169. Harding, S. Abnormalities of the myocytes in ischaemic cardiomyopathy / S.E. Harding, K.T. MacLeod, C.H. Davies, [et al.] // *Eur Heart J*. —1995.—Vol.16 Suppl I, 74-81.
  170. Hayashi, T. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy / T. Hayashi, T. Arimura, M. Itoh-Satoh, [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. —2004.—Vol.44, №11.— P.2192-201.
  171. Heineke, J. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc / J. Heineke, H. Ruetten, C. Willenbockel, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. —2005.—Vol.102, №5.— P.1655-60.
  172. Herrmann, H. Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity / H. Herrmann, S.V. Strelkov, P. Burkhard, [et al.] // *J Clin Invest*. —2009.—Vol.119, №7.— P.1772-83.

173. Hetzer, R. Role of paediatric assist device in bridge to transplant / R. Hetzer, M. Javier, E.M. Delmo Walter // *Ann Cardiothorac Surg.* —2018.—Vol.7, №1.— P.82-98.
174. Hijikata, T. Plectin is a linker of intermediate filaments to Z-discs in skeletal muscle fibers / T. Hijikata, T. Murakami, M. Imamura, [et al.] // *J Cell Sci.* — 1999.—Vol.112 ( Pt 6), 867-76.
175. Hinze, F. Reducing RBM20 activity improves diastolic dysfunction and cardiac atrophy / F. Hinze, C. Dieterich, M.H. Radke, [et al.] // *J Mol Med (Berl).* — 2016.—Vol.94, №12.— P.1349-58.
176. Hoedemaekers, Y. Cardiac beta-myosin heavy chain defects in two families with non-compaction cardiomyopathy: linking non-compaction to hypertrophic, restrictive, and dilated cardiomyopathies / Y.M. Hoedemaekers, K. Caliskan, D. Majoor-Krakauer, [et al.] // *Eur Heart J.* —2007.—Vol.28, №22.— P.2732-7.
177. Hoffman, E. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus / E.P. Hoffman, R.H. Brown, Jr., L.M. Kunkel // *Cell.* —1987.—Vol.51, №6.— P.919-28.
178. Hojayevev, B. FHL2 binds calcineurin and represses pathological cardiac growth / B. Hojayevev, B.A. Rothermel, T.G. Gillette, [et al.] // *Mol Cell Biol.* —2012.—Vol.32, №19.— P.4025-34.
179. Hoya, S. Updated meta-analysis of CMYA5 rs3828611 and rs4704591 with schizophrenia in Asian populations / S. Hoya, Y. Watanabe, M. Shibuya, [et al.] // *Early Interv Psychiatry.* —2018.—Vol.12, №5.— P.938-41.
180. Hsiung, A. A schizophrenia associated CMYA5 allele displays differential binding with desmin / A. Hsiung, F.J. Naya, X. Chen, [et al.] // *J Psychiatr Res.* —2019.— Vol.111, 8-15.
181. Hu, C. Variants from GIPR, TCF7L2, DGKB, MADD, CRY2, GLIS3, PROX1, SLC30A8 and IGF1 are associated with glucose metabolism in the Chinese / C. Hu, R. Zhang, C. Wang, [et al.] // *PLoS One.* —2010.—Vol.5, №11.— P.e15542.
182. Huang, Y. alphaB-Crystallin Interacts with Nav1.5 and Regulates Ubiquitination and Internalization of Cell Surface Nav1.5 / Y. Huang, Z. Wang, Y. Liu, [et al.] // *J Biol Chem.* —2016.—Vol.291, №21.— P.11030-41.
183. Huyghe, J. Exome array analysis identifies new loci and low-frequency variants influencing insulin processing and secretion / J.R. Huyghe, A.U. Jackson, M.P. Fogarty, [et al.] // *Nat Genet.* —2013.—Vol.45, №2.— P.197-201.
184. Hwang, P. The cardiac-specific N-terminal region of troponin I positions the regulatory domain of troponin C / P.M. Hwang, F. Cai, S.E. Pineda-Sanabria, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* —2014.—Vol.111, №40.— P.14412-7.
185. Inagaki, N. Alpha B-crystallin mutation in dilated cardiomyopathy / N. Inagaki, T. Hayashi, T. Arimura, [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* —2006.— Vol.342, №2.— P.379-86.
186. Inci, A. Patient With Niemann-Pick Type C Presenting With a Jaw Mass Characterized With Lymph Node Involvement by Niemann-Pick Cells / A. Inci, I. Okur, G. Esendagli, [et al.] // *J Pediatr Hematol Oncol.* —2018.—Vol.40, №3.— P.243-5.

187. Ingber, D. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction / D.E. Ingber // *Annu Rev Physiol.* —1997.—Vol.59, 575-99.
188. Ingelsson, E. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic Loci regulating glucose and insulin metabolism in humans / E. Ingelsson, C. Langenberg, M.F. Hivert, [et al.] // *Diabetes.* —2010.—Vol.59, №5.— P.1266-75.
189. Jacques, A. Myosin binding protein C phosphorylation in normal, hypertrophic and failing human heart muscle / A.M. Jacques, O. Copeland, A.E. Messer, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2008.—Vol.45, №2.— P.209-16.
190. Jaffer, F. BAG3 mutations: another cause of giant axonal neuropathy / F. Jaffer, S.M. Murphy, M. Scoto, [et al.] // *J Peripher Nerv Syst.* —2012.—Vol.17, №2.— P.210-6.
191. James, P. ATP binding site of mitochondrial creatine kinase. Affinity labelling of Asp-335 with C1RATP / P. James, M. Wyss, S. Lutsenko, [et al.] // *FEBS Lett.* —1990.—Vol.273, №1-2.— P.139-43.
192. Janin, A. Truncating mutations on myofibrillar myopathies causing genes as prevalent molecular explanations on patients with dilated cardiomyopathy / A. Janin, K. N'Guyen, G. Habib, [et al.] // *Clin Genet.* —2017.—Vol.92, №6.— P.616-23.
193. Joung, B. Atrial fibrillation patients with hypertrophic cardiomyopathy: Do we need new stroke risk stratification? / B. Joung, G.Y.H. Lip // *Heart Rhythm.* —2019.—Vol.
194. Judge, L. A BAG3 chaperone complex maintains cardiomyocyte function during proteotoxic stress / L.M. Judge, J.A. Perez-Bermejo, A. Truong, [et al.] // *JCI Insight.* —2017.—Vol.2, №14.— P.
195. Karam, S. A de novo mutation of the beta cardiac myosin heavy chain gene in an infantile restrictive cardiomyopathy / S. Karam, M.J. Raboisson, C. Ducreux, [et al.] // *Congenit Heart Dis.* —2008.—Vol.3, №2.— P.138-43.
196. Karkkainen, S. Novel mutations in the lamin A/C gene in heart transplant recipients with end stage dilated cardiomyopathy / S. Karkkainen, E. Reissell, T. Helio, [et al.] // *Heart.* —2006.—Vol.92, №4.— P.524-6.
197. Kaski, J. Idiopathic restrictive cardiomyopathy in children is caused by mutations in cardiac sarcomere protein genes / J.P. Kaski, P. Syrris, M. Burch, [et al.] // *Heart.* —2008.—Vol.94, №11.— P.1478-84.
198. Kataoka, A. Computational simulation of hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin I: influence of increased myofilament calcium sensitivity on isometric force, ATPase and  $[Ca^{2+}]_i$  / A. Kataoka, C. Hemmer, P.B. Chase // *J Biomech.* —2007.—Vol.40, №9.— P.2044-52.
199. Kato, K. LMNA cardiomyopathy detected in Japanese arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy cohort / K. Kato, N. Takahashi, Y. Fujii, [et al.] // *J Cardiol.* —2016.—Vol.68, №4.— P.346-51.
200. Kayvanpour, E. Genotype-phenotype associations in dilated cardiomyopathy: meta-analysis on more than 8000 individuals / E. Kayvanpour, F. Sedaghat-Hamedani, A. Amr, [et al.] // *Clin Res Cardiol.* —2017.—Vol.106, №2.— P.127-39.



201. Keller, D. Human homozygous R403W mutant cardiac myosin presents disproportionate enhancement of mechanical and enzymatic properties / D.I. Keller, C. Coirault, T. Rau, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2004.—Vol.36, №3.— P.355-62.
202. Kielbasa, O. Myospryn is a calcineurin-interacting protein that negatively modulates slow-fiber-type transformation and skeletal muscle regeneration / O.M. Kielbasa, J.G. Reynolds, C.L. Wu, [et al.] // *FASEB J.* —2011.—Vol.25, №7.— P.2276-86.
203. Kim, H. Expression of intermediate filament desmin and vimentin in the human fetal heart / H.D. Kim // *Anat Rec.* —1996.—Vol.246, №2.— P.271-8.
204. Kimura, A. Mutations in the cardiac troponin I gene associated with hypertrophic cardiomyopathy / A. Kimura, H. Harada, J.E. Park, [et al.] // *Nat Genet.* —1997.— Vol.16, №4.— P.379-82.
205. Kirichok, Y. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel / Y. Kirichok, G. Krapivinsky, D.E. Clapham // *Nature.* —2004.—Vol.427, №6972.— P.360-4.
206. Kitsios, G. Genetic variation associated with ischemic heart failure: a HuGE review and meta-analysis / G. Kitsios, E. Zintzaras // *Am J Epidemiol.* —2007.—Vol.166, №6.— P.619-33.
207. Kiviahho, A. Distinct electrophysiological and mechanical beating phenotypes of long QT syndrome type 1-specific cardiomyocytes carrying different mutations / A.L. Kiviahho, A. Ahola, K. Larsson, [et al.] // *Int J Cardiol Heart Vasc.* —2015.— Vol.8, 19-31.
208. Klauke, B. De novo desmin-mutation N116S is associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / B. Klauke, S. Kossmann, A. Gaertner, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —2010.—Vol.19, №23.— P.4595-607.
209. Kley, R. Pathophysiology of protein aggregation and extended phenotyping in filaminopathy / R.A. Kley, P. Serdaroglu-Oflazer, Y. Leber, [et al.] // *Brain.* — 2012.—Vol.135, №Pt 9.— P.2642-60.
210. Knoblauch, H. Contractures and hypertrophic cardiomyopathy in a novel FHL1 mutation / H. Knoblauch, C. Geier, S. Adams, [et al.] // *Ann Neurol.* —2010.— Vol.67, №1.— P.136-40.
211. Kobirumaki-Shimozawa, F. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism / F. Kobirumaki-Shimozawa, T. Inoue, S.A. Shintani, [et al.] // *J Physiol Sci.* —2014.—Vol.64, №4.— P.221-32.
212. Kohler, J. Familial hypertrophic cardiomyopathy mutations in troponin I (K183D, G203S, K206Q) enhance filament sliding / J. Kohler, Y. Chen, B. Brenner, [et al.] // *Physiol Genomics.* —2003.—Vol.14, №2.— P.117-28.
213. Kokado, H. Clinical features of hypertrophic cardiomyopathy caused by a Lys183 deletion mutation in the cardiac troponin I gene / H. Kokado, M. Shimizu, H. Yoshio, [et al.] // *Circulation.* —2000.—Vol.102, №6.— P.663-9.
214. Konersman, C. BAG3 myofibrillar myopathy presenting with cardiomyopathy / C.G. Konersman, B.J. Bordini, G. Scharer, [et al.] // *Neuromuscul Disord.* — 2015.—Vol.25, №5.— P.418-22.

215. Kostareva, A. Deletion in TNNI3 gene is associated with restrictive cardiomyopathy / A. Kostareva, A. Gudkova, G. Sjoberg, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2009.—Vol.131, №3.— P.410-2.
216. Kostareva, A. Mice expressing L345P mutant desmin exhibit morphological and functional changes of skeletal and cardiac mitochondria / A. Kostareva, G. Sjoberg, J. Bruton, [et al.] // *J Muscle Res Cell Motil.* —2008.—Vol.29, №1.— P.25-36.
217. Kostera-Pruszczyk, A. BAG3-related myopathy, polyneuropathy and cardiomyopathy with long QT syndrome / A. Kostera-Pruszczyk, M. Suszek, R. Ploski, [et al.] // *J Muscle Res Cell Motil.* —2015.—Vol.36, №6.— P.423-32.
218. Kotter, S. Titin: central player of hypertrophic signaling and sarcomeric protein quality control / S. Kotter, C. Andresen, M. Kruger // *Biol Chem.* —2014.—Vol.395, №11.— P.1341-52.
219. Kotter, S. Titin-Based Cardiac Myocyte Stiffening Contributes to Early Adaptive Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction / S. Kotter, M. Kazmierowska, C. Andresen, [et al.] // *Circ Res.* —2016.—Vol.119, №9.— P.1017-29.
220. Kouloumenta, A. Proper perinuclear localization of the TRIM-like protein myospryn requires its binding partner desmin / A. Kouloumenta, M. Mavroidis, Y. Capetanaki // *J Biol Chem.* —2007.—Vol.282, №48.— P.35211-21.
221. Kowlessur, D. Significance of troponin dynamics for Ca<sup>2+</sup>-mediated regulation of contraction and inherited cardiomyopathy / D. Kowlessur, L.S. Tobacman // *J Biol Chem.* —2012.—Vol.287, №50.— P.42299-311.
222. Kreplak, L. Severe myopathy mutations modify the nanomechanics of desmin intermediate filaments / L. Kreplak, H. Bar // *J Mol Biol.* —2009.—Vol.385, №4.— P.1043-51.
223. Kruger, M. Titin, a Central Mediator for Hypertrophic Signaling, Exercise-Induced Mechanosignaling and Skeletal Muscle Remodeling / M. Kruger, S. Kotter // *Front Physiol.* —2016.—Vol.7, 76.
224. Kruger, M. Protein kinase-A phosphorylates titin in human heart muscle and reduces myofibrillar passive tension / M. Kruger, W.A. Linke // *J Muscle Res Cell Motil.* —2006.—Vol.27, №5-7.— P.435-44.
225. Kubo, T. Prevalence, clinical significance, and genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy with restrictive phenotype / T. Kubo, J.R. Gimeno, A. Bahl, [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* —2007.—Vol.49, №25.— P.2419-26.
226. Kumar, M. Cardiac Myosin-binding Protein C and Troponin-I Phosphorylation Independently Modulate Myofilament Length-dependent Activation / M. Kumar, S. Govindan, M. Zhang, [et al.] // *J Biol Chem.* —2015.—Vol.290, №49.— P.29241-9.
227. Kumar, S. Role of common sarcomeric gene polymorphisms in genetic susceptibility to left ventricular dysfunction / S. Kumar, A. Mishra, A. Srivastava, [et al.] // *J Genet.* —2016.—Vol.95, №2.— P.263-72.
228. Kunst, G. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2 / G. Kunst, K.R. Kress, M. Gruen, [et al.] // *Circ Res.* —2000.—Vol.86, №1.— P.51-8.

229. Kurada, B. MADD, a splice variant of IG20, is indispensable for MAPK activation and protection against apoptosis upon tumor necrosis factor-alpha treatment / B.R. Kurada, L.C. Li, N. Mulherkar, [et al.] // *J Biol Chem.* —2009.—Vol.284, №20.— P.13533-41.
230. Kuster, D. Cardiac myosin binding protein C phosphorylation in cardiac disease / D.W. Kuster, A.C. Bawazeer, R. Zaremba, [et al.] // *J Muscle Res Cell Motil.* — 2012.—Vol.33, №1.— P.43-52.
231. Lang, R. Functional analysis of a troponin I (R145G) mutation associated with familial hypertrophic cardiomyopathy / R. Lang, A.V. Gomes, J. Zhao, [et al.] // *J Biol Chem.* —2002.—Vol.277, №14.— P.11670-8.
232. Lattanzi, G. Laminopathies / G. Lattanzi, L. Maggi, D. Araujo-Vilar // *Nucleus.* — 2018.—Vol.9, №1.— P.543-4.
233. Layland, J. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation / J. Layland, R.J. Solaro, A.M. Shah // *Cardiovasc Res.* —2005.— Vol.66, №1.— P.12-21.
234. Lazarides, E. Desmin and intermediate filaments in muscle cells / E. Lazarides // *Results Probl Cell Differ.* —1980.—Vol.11, 124-31.
235. Leber, Y. Filamin C is a highly dynamic protein associated with fast repair of myofibrillar microdamage / Y. Leber, A.A. Ruparelia, G. Kirfel, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —2016.—Vol.25, №13.— P.2776-88.
236. Lee, H. BAG3-related myofibrillar myopathy in a Chinese family / H.C. Lee, S.W. Cherk, S.K. Chan, [et al.] // *Clin Genet.* —2012.—Vol.81, №4.— P.394-8.
237. Lee, S. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells / S. Lee, J.R. Park, M.S. Seo, [et al.] // *Cell proliferation.* —2009.—Vol.42, №6.— P.711-20.
238. Levine, A. Advanced Heart Failure Management and Transplantation / A. Levine, C.A. Gupta, A. Gass // *Cardiol Clin.* —2019.—Vol.37, №1.— P.105-11.
239. Levitas, A. D117N in Cypher/ZASP may not be a causative mutation for dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmias / A. Levitas, Y. Konstantino, E. Muhammad, [et al.] // *Eur J Hum Genet.* —2016.—Vol.24, №5.— P.666-71.
240. Levy, W. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure / W.C. Levy, D. Mozaffarian, D.T. Linker, [et al.] // *Circulation.* —2006.—Vol.113, №11.— P.1424-33.
241. LeWinter, M. Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure with a preserved ejection fraction: If it's not one thing it's another / M.M. LeWinter, M. Meyer // *Circ Heart Fail.* —2013.—Vol.6, №6.— P.1112-5.
242. Leyden, J. Oral cavity pyogenic granuloma / J.J. Leyden, G.H. Master // *Arch Dermatol.* —1973.—Vol.108, №2.— P.226-8.
243. Li, D. Identification of novel mutations in RBM20 in patients with dilated cardiomyopathy / D. Li, A. Morales, J. Gonzalez-Quintana, [et al.] // *Clin Transl Sci.* —2010.—Vol.3, №3.— P.90-7.
244. Li, H. Voltage-Dependent Anion Channel 1(VDAC1) Participates the Apoptosis of the Mitochondrial Dysfunction in Desminopathy / H. Li, L. Zheng, Y. Mo, [et al.] // *PLoS One.* —2016.—Vol.11, №12.— P.e0167908.

245. Li, M. A common variant of the cardiomyopathy associated 5 gene (CMYA5) is associated with schizophrenia in Chinese population / M. Li, X.J. Luo, X. Zhang, [et al.] // *Schizophr Res.* —2011.—Vol.129, №2-3.— P.217-9.
246. Li, Y. Correcting diastolic dysfunction by Ca<sup>2+</sup> desensitizing troponin in a transgenic mouse model of restrictive cardiomyopathy / Y. Li, P.Y. Charles, C. Nan, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2010.—Vol.49, №3.— P.402-11.
247. Li, Y. Biophysical regulation of histone acetylation in mesenchymal stem cells / Y. Li, J.S. Chu, K. Kurpinski, [et al.] // *Biophys J.* —2011.—Vol.100, №8.— P.1902-9.
248. Li, Z. Cardiovascular lesions and skeletal myopathy in mice lacking desmin / Z. Li, E. Colucci-Guyon, M. Pincon-Raymond, [et al.] // *Dev Biol.* —1996.—Vol.175, №2.— P.362-6.
249. Limongelli, G. Left Atrial Volume during Stress Is Associated with Increased Risk of Arrhythmias in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy / G. Limongelli, V. Fioretti, M. Di Maio, [et al.] // *J Cardiovasc Echogr.* —2019.—Vol.29, №1.— P.1-6.
250. Linden, M. Effects of desmin gene knockout on mice heart mitochondria / M. Linden, Z. Li, D. Paulin, [et al.] // *J Bioenerg Biomembr.* —2001.—Vol.33, №4.— P.333-41.
251. Lindert, S. Effects of HCM cTnI mutation R145G on troponin structure and modulation by PKA phosphorylation elucidated by molecular dynamics simulations / S. Lindert, Y. Cheng, P. Kekenes-Huskey, [et al.] // *Biophys J.* —2015.—Vol.108, №2.— P.395-407.
252. Linke, W. Gigantic business: titin properties and function through thick and thin / W.A. Linke, N. Hamdani // *Circ Res.* —2014.—Vol.114, №6.— P.1052-68.
253. Linschoten, M. Truncating Titin (TTN) Variants in Chemotherapy-Induced Cardiomyopathy / M. Linschoten, A.J. Teske, A.F. Baas, [et al.] // *J Card Fail.* —2017.—Vol.23, №6.— P.476-9.
254. Liu, Y. A novel alphaB-crystallin mutation associated with autosomal dominant congenital lamellar cataract / Y. Liu, X. Zhang, L. Luo, [et al.] // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* —2006.—Vol.47, №3.— P.1069-75.
255. Lombardi, R. Molecular genetics and pathogenesis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: a disease of cardiac stem cells / R. Lombardi, A.J. Marian // *Pediatr Cardiol.* —2011.—Vol.32, №3.— P.360-5.
256. Lopes, L. Genetic characterization and genotype-phenotype associations in a large cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy - An ancillary study of the Portuguese registry of hypertrophic cardiomyopathy / L.R. Lopes, D. Brito, A. Belo, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2019.—Vol.278, 173-9.
257. Lopes, L. Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy / L.R. Lopes, P. Syrris, O.P. Guttman, [et al.] // *Heart.* —2015.—Vol.101, №4.— P.294-301.
258. Lopes, L. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing / L.R. Lopes, A. Zekavati, P. Syrris, [et al.] // *J Med Genet.* —2013.—Vol.50, №4.— P.228-39.

259. Lornage, X. Recessive MYPN mutations cause cap myopathy with occasional nemaline rods / X. Lornage, E. Malfatti, C. Cheraud, [et al.] // *Ann Neurol.* — 2017.—Vol.81, №3.— P.467-73.
260. Lund, E. Nuclear lamins: making contacts with promoters / E. Lund, P. Collas // *Nucleus.* —2013.—Vol.4, №6.— P.424-30.
261. Luzum, J. Association of Genetic Polymorphisms in the Beta-1 Adrenergic Receptor with Recovery of Left Ventricular Ejection Fraction in Patients with Heart Failure / J.A. Luzum, J.D. English, U.S. Ahmad, [et al.] // *J Cardiovasc Transl Res.* —2019.—Vol.
262. Lyon, R. Mechanotransduction in cardiac hypertrophy and failure / R.C. Lyon, F. Zanella, J.H. Omens, [et al.] // *Circ Res.* —2015.—Vol.116, №8.— P.1462-76.
263. Ma, X. Transcription Factor EB Activation Rescues Advanced alphaB-Crystallin Mutation-Induced Cardiomyopathy by Normalizing Desmin Localization / X. Ma, K. Mani, H. Liu, [et al.] // *J Am Heart Assoc.* —2019.—Vol.8, №4.— P.e010866.
264. Mado, K. On the role of tubulin, plectin, desmin, and vimentin in the regulation of mitochondrial energy fluxes in muscle cells / K. Mado, V. Chekulayev, I. Shevchuk, [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* —2019.—Vol.316, №5.— P.C657-C67.
265. Maloyan, A. Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy / A. Maloyan, A. Sanbe, H. Osinska, [et al.] // *Circulation.* —2005.—Vol.112, №22.— P.3451-61.
266. Margossian, S. Preparation of myosin and its subfragments from rabbit skeletal muscle / S.S. Margossian, S. Lowey // *Methods Enzymol.* —1982.—Vol.85 Pt B, 55-71.
267. Maron, B. 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 Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention / B.J. Maron, J.A. Towbin, G. Thiene, [et al.] // *Circulation.* —2006.—Vol.113, №14.— P.1807-16.
268. Marsman, R. A complex double deletion in LMNA underlies progressive cardiac conduction disease, atrial arrhythmias, and sudden death / R.F. Marsman, A. Bardai, A.V. Postma, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2011.—Vol.4, №3.— P.280-7.
269. Maskatia, S. Restrictive physiology is associated with poor outcomes in children with hypertrophic cardiomyopathy / S.A. Maskatia, J.A. Decker, J.A. Spinner, [et al.] // *Pediatr Cardiol.* —2012.—Vol.33, №1.— P.141-9.
270. McKenna, W. Classification, Epidemiology, and Global Burden of Cardiomyopathies / W.J. McKenna, B.J. Maron, G. Thiene // *Circ Res.* —2017.—Vol.121, №7.— P.722-30.
271. McLendon, P. Desmin-related cardiomyopathy: an unfolding story / P.M. McLendon, J. Robbins // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* —2011.—Vol.301, №4.— P.H1220-8.

272. Memo, M. Familial dilated cardiomyopathy mutations uncouple troponin I phosphorylation from changes in myofibrillar Ca(2)(+) sensitivity / M. Memo, M.C. Leung, D.G. Ward, [et al.] // *Cardiovasc Res.* —2013.—Vol.99, №1.— P.65-73.
273. Menon, S. Cardiac troponin T mutation in familial cardiomyopathy with variable remodeling and restrictive physiology / S.C. Menon, V.V. Michels, P.A. Pellikka, [et al.] // *Clin Genet.* —2008.—Vol.74, №5.— P.445-54.
274. Mercer, E. Hspb7 is a cardioprotective chaperone facilitating sarcomeric proteostasis / E.J. Mercer, Y.F. Lin, L. Cohen-Gould, [et al.] // *Dev Biol.* —2018.— Vol.435, №1.— P.41-55.
275. Mercuri, E. Extreme variability of skeletal and cardiac muscle involvement in patients with mutations in exon 11 of the lamin A/C gene / E. Mercuri, S.C. Brown, P. Nihoyannopoulos, [et al.] // *Muscle Nerve.* —2005.—Vol.31, №5.— P.602-9.
276. 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.1085-99.
277. Millay, D. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation / D.P. Millay, J.R. O'Rourke, L.B. Sutherland, [et al.] // *Nature.* — 2013.—Vol.499, №7458.— P.301-5.
278. Millay, D. Myomaker is essential for muscle regeneration / D.P. Millay, L.B. Sutherland, R. Bassel-Duby, [et al.] // *Genes Dev.* —2014.—Vol.28, №15.— P.1641-6.
279. Milner, D. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function / D.J. Milner, M. Mavroidis, N. Weisleder, [et al.] // *J Cell Biol.* —2000.—Vol.150, №6.— P.1283-98.
280. Mogensen, J. A Systematic Review of Phenotypic Features Associated With Cardiac Troponin I Mutations in Hereditary Cardiomyopathies / J. Mogensen, T. Hey, S. Lambrecht // *Can J Cardiol.* —2015.—Vol.31, №11.— P.1377-85.
281. Mogensen, J. Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations / J. Mogensen, T. Kubo, M. Duque, [et al.] // *J Clin Invest.* —2003.—Vol.111, №2.— P.209-16.
282. Moiescu, D. Calcium and strontium concentration changes within skinned muscle preparations following a change in the external bathing solution / D.G. Moiescu, R. Thieleczek // *J Physiol.* —1978.—Vol.275, 241-62.
283. Morimoto, S. Ca(2+)-desensitizing effect of a deletion mutation Delta K210 in cardiac troponin T that causes familial dilated cardiomyopathy / S. Morimoto, Q.W. Lu, K. Harada, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* —2002.—Vol.99, №2.— P.913-8.
284. Morner, S. Deletion in the cardiac troponin I gene in a family from northern Sweden with hypertrophic cardiomyopathy / S. Morner, P. Richard, E. Kazzam, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2000.—Vol.32, №3.— P.521-5.
285. Mouton, J. MYBPH acts as modifier of cardiac hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) patients / J.M. Mouton, L. van der Merwe, A. Goosen, [et al.] // *Hum Genet.* —2016.—Vol.135, №5.— P.477-83.

286. Muchir, A. Reduced expression of A-type lamins and emerin activates extracellular signal-regulated kinase in cultured cells / A. Muchir, W. Wu, H.J. Worman // *Biochim Biophys Acta*. —2009.—Vol.1792, №1.— P.75-81.
287. Muchtar, E. Restrictive Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy / E. Muchtar, L.A. Blauwet, M.A. Gertz // *Circ Res*. —2017.—Vol.121, №7.— P.819-37.
288. Mulherkar, N. MADD/DENN splice variant of the IG20 gene is a negative regulator of caspase-8 activation. Knockdown enhances TRAIL-induced apoptosis of cancer cells / N. Mulherkar, K.V. Prasad, B.S. Prabhakar // *J Biol Chem*. —2007.—Vol.282, №16.— P.11715-21.
289. Muller, T. Dilated cardiomyopathy may be an early sign of the C826A Fukutin-related protein mutation / T. Muller, M. Krasnianski, R. Witthaut, [et al.] // *Neuromuscul Disord*. —2005.—Vol.15, №5.— P.372-6.
290. Mun, J. Myosin-binding protein C displaces tropomyosin to activate cardiac thin filaments and governs their speed by an independent mechanism / J.Y. Mun, M.J. Previs, H.Y. Yu, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A*. —2014.—Vol.111, №6.— P.2170-5.
291. Muntoni, F. Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy / F. Muntoni, M. Cau, A. Ganau, [et al.] // *The New England journal of medicine*. —1993.—Vol.329, №13.— P.921-5.
292. Murakami, T. Fukutin gene mutations cause dilated cardiomyopathy with minimal muscle weakness / T. Murakami, Y.K. Hayashi, S. Noguchi, [et al.] // *Ann Neurol*. —2006.—Vol.60, №5.— P.597-602.
293. Murphy, E. Mitochondria: from basic biology to cardiovascular disease / E. Murphy, D. Bers, R. Rizzuto // *J Mol Cell Cardiol*. —2009.—Vol.46, №6.— P.765-6.
294. Naito, M. Suppression of lamin A/C by short hairpin RNAs promotes adipocyte lineage commitment in mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 / M. Naito, K. Omoteyama, Y. Mikami, [et al.] // *Histochemistry and cell biology*. —2012.—Vol.137, №2.— P.235-47.
295. Nakagami, H. Gene polymorphism of myospryn (cardiomyopathy-associated 5) is associated with left ventricular wall thickness in patients with hypertension / H. Nakagami, Y. Kikuchi, T. Katsuya, [et al.] // *Hypertens Res*. —2007.—Vol.30, №12.— P.1239-46.
296. Niemoeller, O. Radiotherapy and TRAIL for cancer therapy / O.M. Niemoeller, C. Belka // *Cancer Lett*. —2013.—Vol.332, №2.— P.184-93.
297. Nishikawa, A. Respiratory and cardiac function in japanese patients with dysferlinopathy / A. Nishikawa, M. Mori-Yoshimura, K. Segawa, [et al.] // *Muscle Nerve*. —2016.—Vol.53, №3.— P.394-401.
298. Norrish, G. Risk factors for sudden cardiac death in childhood hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis / G. Norrish, N. Cantarutti, E. Pissaridou, [et al.] // *Eur J Prev Cardiol*. —2017.—Vol.24, №11.— P.1220-30.

299. O'Mahony, C. Effectiveness of the 2014 European Society of Cardiology guideline on sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis / C. O'Mahony, M.M. Akhtar, Z. Anastasiou, [et al.] // *Heart*. — 2019.—Vol.105, №8.— P.623-31.
300. O'Mahony, C. A novel clinical risk prediction model for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy (HCM risk-SCD) / C. O'Mahony, F. Jichi, M. Pavlou, [et al.] // *Eur Heart J*. —2014.—Vol.35, №30.— P.2010-20.
301. Odgerel, Z. Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation / Z. Odgerel, A. Sarkozy, H.S. Lee, [et al.] // *Neuromuscul Disord*. —2010.—Vol.20, №7.— P.438-42.
302. Ortiz-Genga, M. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies / M.F. Ortiz-Genga, S. Cuenca, M. Dal Ferro, [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. —2016.—Vol.68, №22.— P.2440-51.
303. Ostman-Smith, I. Age- and gender-specific mortality rates in childhood hypertrophic cardiomyopathy / I. Ostman-Smith, G. Wettrell, B. Keeton, [et al.] // *Eur Heart J*. —2008.—Vol.29, №9.— P.1160-7.
304. Otomo, J. Electrophysiological and histopathological characteristics of progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene / J. Otomo, S. Kure, T. Shiba, [et al.] // *J Cardiovasc Electrophysiol*. —2005.—Vol.16, №2.— P.137-45.
305. Otten, E. Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks / E. Otten, A. Asimaki, A. Maass, [et al.] // *Heart Rhythm*. — 2010.—Vol.7, №8.— P.1058-64.
306. Paller, M. Restrictive cardiomyopathy: an unusual phenotype of a lamin A variant / M.S. Paller, C.M. Martin, M.E. Pierpont // *ESC Heart Fail*. —2018.—Vol.5, №4.— P.724-6.
307. Pardee, J. Purification of muscle actin / J.D. Pardee, J.A. Spudich // *Methods Enzymol*. —1982.—Vol.85 Pt B, 164-81.
308. Park, K. Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy / K.Y. Park, M.C. Dalakas, H.H. Goebel, [et al.] // *J Med Genet*. —2000.—Vol.37, №11.— P.851-7.
309. Park, Y. Nuclear changes in skeletal muscle extend to satellite cells in autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy/limb-girdle muscular dystrophy 1B / Y.E. Park, Y.K. Hayashi, K. Goto, [et al.] // *Neuromuscul Disord*. —2009.— Vol.19, №1.— P.29-36.
310. Parks, S. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy / S.B. Parks, J.D. Kushner, D. Nauman, [et al.] // *Am Heart J*. —2008.—Vol.156, №1.— P.161-9.
311. Patel, S. Outcomes of Restrictive and Hypertrophic Cardiomyopathies After LVAD: An INTERMACS Analysis / S.R. Patel, O. Saeed, D. Naftel, [et al.] // *J Card Fail*. —2017.—Vol.23, №12.— P.859-67.
312. Paulin, D. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle / D. Paulin, Z. Li // *Exp Cell Res*. —2004.— Vol.301, №1.— P.1-7.



313. Peddy, S. Infantile restrictive cardiomyopathy resulting from a mutation in the cardiac troponin T gene / S.B. Peddy, L.A. Vricella, J.E. Crosson, [et al.] // *Pediatrics*. —2006.—Vol.117, №5.— P.1830-3.
314. Pekovic, V. Nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts / V. Pekovic, J. Harborth, J.L. Broers, [et al.] // *J Cell Biol*. —2007.—Vol.176, №2.— P.163-72.
315. Peled, Y. Titin mutation in familial restrictive cardiomyopathy / Y. Peled, M. Gramlich, G. Yoskovitz, [et al.] // *Int J Cardiol*. —2014.—Vol.171, №1.— P.24-30.
316. Pereira, N. A functional genetic variant (N521D) in natriuretic peptide receptor 3 is associated with diastolic dysfunction: the prevalence of asymptomatic ventricular dysfunction study / N.L. Pereira, M.M. Redfield, C. Scott, [et al.] // *PLoS One*. —2014.—Vol.9, №1.— P.e85708.
317. Perepelina, K. Lamin A/C mutation associated with lipodystrophy influences adipogenic differentiation of stem cells through interaction with Notch signaling / K. Perepelina, R. Dmitrieva, E. Ignatieva, [et al.] // *Biochem Cell Biol*. —2018.— Vol.96, №3.— P.342-8.
318. Pignatelli, R. Clinical characterization of left ventricular noncompaction in children: a relatively common form of cardiomyopathy / R.H. Pignatelli, C.J. McMahon, W.J. Dreyer, [et al.] // *Circulation*. —2003.—Vol.108, №21.— P.2672-8.
319. Pinol-Ripoll, G. Severe infantile-onset cardiomyopathy associated with a homozygous deletion in desmin / G. Pinol-Ripoll, A. Shatunov, A. Cabello, [et al.] // *Neuromuscul Disord*. —2009.—Vol.19, №6.— P.418-22.
320. Ploski, R. Evidence for troponin C (TNNC1) as a gene for autosomal recessive restrictive cardiomyopathy with fatal outcome in infancy / R. Ploski, M. Rydzanicz, T.M. Ksiazczyk, [et al.] // *Am J Med Genet A*. —2016.—Vol.170, №12.— P.3241-8.
321. Pocock, S. Predicting survival in heart failure: a risk score based on 39 372 patients from 30 studies / S.J. Pocock, C.A. Ariti, J.J. McMurray, [et al.] // *Eur Heart J*. — 2013.—Vol.34, №19.— P.1404-13.
322. Polina, E. Relationship of polymorphisms in the tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and -2 genes with chronic heart failure / E.R. Polina, R. Araujo, R.C. Sbruzzi, [et al.] // *Sci Rep*. —2018.—Vol.8, №1.— P.9446.
323. Ponikowski, P. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC / P. Ponikowski, A.A. Voors, S.D. Anker, [et al.] // *Eur Heart J*. —2016.—Vol.37, №27.— P.2129-200.
324. Prokocimer, M. Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities / M. Prokocimer, M. Davidovich, M. Nissim-Rafinia, [et al.] // *J Cell Mol Med*. — 2009.—Vol.13, №6.— P.1059-85.

325. Pruszczyk, P. Restrictive cardiomyopathy with atrioventricular conduction block resulting from a desmin mutation / P. Pruszczyk, A. Kostera-Pruszczyk, A. Shatunov, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2007.—Vol.117, №2.— P.244-53.
326. Pugh, T. The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing / T.J. Pugh, M.A. Kelly, S. Gowrisankar, [et al.] // *Genet Med.* —2014.—Vol.16, №8.— P.601-8.
327. Purevjav, E. Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis / E. Purevjav, J. Varela, M. Morgado, [et al.] // *J Am Coll Cardiol.* —2010.—Vol.56, №18.— P.1493-502.
328. Quintana, M. Cardiomyocyte-Specific Human Bcl2-Associated Anthanogene 3 P209L Expression Induces Mitochondrial Fragmentation, Bcl2-Associated Anthanogene 3 Haploinsufficiency, and Activates p38 Signaling / M.T. Quintana, T.L. Parry, J. He, [et al.] // *Am J Pathol.* —2016.—Vol.186, №8.— P.1989-2007.
329. Raffaello, A. The mitochondrial Ca(2+) uniporter / A. Raffaello, D. De Stefani, R. Rizzuto // *Cell Calcium.* —2012.—Vol.52, №1.— P.16-21.
330. Rafiq, M. Whole exome sequencing identified 1 base pair novel deletion in BCL2-associated athanogene 3 (BAG3) gene associated with severe dilated cardiomyopathy (DCM) requiring heart transplant in multiple family members / M.A. Rafiq, A. Chaudhry, M. Care, [et al.] // *Am J Med Genet A.* —2017.—Vol.173, №3.— P.699-705.
331. Rai, T. Genetic and clinical profile of Indian patients of idiopathic restrictive cardiomyopathy with and without hypertrophy / T.S. Rai, S. Ahmad, T.S. Ahluwalia, [et al.] // *Mol Cell Biochem.* —2009.—Vol.331, №1-2.— P.187-92.
332. Ramirez, J. Sudden cardiac death and pump failure death prediction in chronic heart failure by combining ECG and clinical markers in an integrated risk model / J. Ramirez, M. Orini, A. Mincholé, [et al.] // *PLoS One.* —2017.—Vol.12, №10.— P.e0186152.
333. Rao, V. PKA phosphorylation of cardiac troponin I modulates activation and relaxation kinetics of ventricular myofibrils / V. Rao, Y. Cheng, S. Lindert, [et al.] // *Biophys J.* —2014.—Vol.107, №5.— P.1196-204.
334. Rapizzi, E. Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria / E. Rapizzi, P. Pinton, G. Szabadkai, [et al.] // *J Cell Biol.* —2002.—Vol.159, №4.— P.613-24.
335. Rappaport, L. Cytoskeleton and mitochondrial morphology and function / L. Rappaport, P. Oliviero, J.L. Samuel // *Mol Cell Biochem.* —1998.—Vol.184, №1-2.— P.101-5.
336. Rauner, M. Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis / M. Rauner, W. Sipos, C. Goettsch, [et al.] // *J Bone Miner Res.* —2009.—Vol.24, №1.— P.78-86.
337. Razumova, M. Effects of the N-terminal domains of myosin binding protein-C in an in vitro motility assay: Evidence for long-lived cross-bridges / M.V. Razumova, J.F. Shaffer, A.Y. Tu, [et al.] // *J Biol Chem.* —2006.—Vol.281, №47.— P.35846-54.

338. Reiffert, S. Characterization of the cardiac holotroponin complex reconstituted from native cardiac troponin T and recombinant I and C / S. Reiffert, R. Maytum, M. Geeves, [et al.] // *Eur J Biochem.* —1999.—Vol.261, №1.— P.40-7.
339. Reinstein, E. Congenital dilated cardiomyopathy caused by biallelic mutations in Filamin C / E. Reinstein, A. Gutierrez-Fernandez, S. Tzur, [et al.] // *Eur J Hum Genet.* —2016.—Vol.24, №12.— P.1792-6.
340. Reynolds, J. Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy / J.G. Reynolds, S.A. McCalmon, J.A. Donaghey, [et al.] // *J Biol Chem.* —2008.—Vol.283, №13.— P.8070-4.
341. Richard, P. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy / P. Richard, P. Charron, L. Carrier, [et al.] // *Circulation.* —2003.—Vol.107, №17.— P.2227-32.
342. 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.] // *Genet Med.* —2015.—Vol.17, №5.— P.405-24.
343. 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, W. McKenna, M. Bristow, [et al.] // *Circulation.* —1996.—Vol.93, №5.— P.841-2.
344. Rizzuto, R. Mitochondria as biosensors of calcium microdomains / R. Rizzuto, P. Pinton, M. Brini, [et al.] // *Cell Calcium.* —1999.—Vol.26, №5.— P.193-9.
345. Rizzuto, R. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses / R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington, [et al.] // *Science.* —1998.—Vol.280, №5370.— P.1763-6.
346. Roberts, A. 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.] // *Sci Transl Med.* —2015.—Vol.7, №270.— P.270ra6.
347. Rowin, E. Clinical Profile and Consequences of Atrial Fibrillation in Hypertrophic Cardiomyopathy / E.J. Rowin, A. Hausvater, M.S. Link, [et al.] // *Circulation.* —2017.—Vol.136, №25.— P.2420-36.
348. Rubattu, S. A Next-Generation Sequencing Approach to Identify Gene Mutations in Early- and Late-Onset Hypertrophic Cardiomyopathy Patients of an Italian Cohort / S. Rubattu, C. Bozzao, E. Pennacchini, [et al.] // *Int J Mol Sci.* —2016.— Vol.17, №8.— P.
349. Ruparelia, A. FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency / A.A. Ruparelia, V. Oorschot, G. Ramm, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —2016.—Vol.25, №11.— P.2131-42.
350. Russo, G. Reasons why patients suffering from chronic heart failure at very low risk for mortality die / G. Russo, G. Cioffi, G. Pulignano, [et al.] // *Int J Cardiol.* —2016.—Vol.223, 947-52.
351. Rybakova, I. Myosin binding protein C interaction with actin: characterization and mapping of the binding site / I.N. Rybakova, M.L. Greaser, R.L. Moss // *J Biol Chem.* —2011.—Vol.286, №3.— P.2008-16.

352. Sabatelli, M. Peripheral neuropathy with giant axons and cardiomyopathy associated with desmin type intermediate filaments in skeletal muscle / M. Sabatelli, E. Bertini, E. Ricci, [et al.] // *J Neurol Sci.* —1992.—Vol.109, №1.— P.1-10.
353. Sacconi, S. A novel CRYAB mutation resulting in multisystemic disease / S. Sacconi, L. Feasson, J.C. Antoine, [et al.] // *Neuromuscul Disord.* —2012.— Vol.22, №1.— P.66-72.
354. Sadoshima, J. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress / J. Sadoshima, S. Izumo // *Annu Rev Physiol.* —1997.—Vol.59, 551-71.
355. Saks, V. Permeabilized cell and skinned fiber techniques in studies of mitochondrial function in vivo / V.A. Saks, V.I. Veksler, A.V. Kuznetsov, [et al.] // *Mol Cell Biochem.* —1998.—Vol.184, №1-2.— P.81-100.
356. San Roman, I. Unclassifiable arrhythmic cardiomyopathy associated with Emery-Dreifuss caused by a mutation in FHL1 / I. San Roman, M. Navarro, F. Martinez, [et al.] // *Clin Genet.* —2016.—Vol.90, №2.— P.171-6.
357. Sarparanta, J. Interactions with M-band titin and calpain 3 link myospryn (CMYA5) to tibial and limb-girdle muscular dystrophies / J. Sarparanta, G. Blandin, K. Charton, [et al.] // *J Biol Chem.* —2010.—Vol.285, №39.— P.30304-15.
358. Sawano, M. Performance of the MAGGIC heart failure risk score and its modification with the addition of discharge natriuretic peptides / M. Sawano, Y. Shiraishi, S. Kohsaka, [et al.] // *ESC Heart Fail.* —2018.—Vol.5, №4.— P.610-9.
359. Scaffidi, P. Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing / P. Scaffidi, T. Misteli // *Nat Cell Biol.* —2008.—Vol.10, №4.— P.452-9.
360. Schafer, S. Titin-truncating variants affect heart function in disease cohorts and the general population / S. Schafer, A. de Marvao, E. Adami, [et al.] // *Nat Genet.* — 2017.—Vol.49, №1.— P.46-53.
361. Schirmer, E. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions / E.C. Schirmer, R. Foisner // *Exp Cell Res.* —2007.—Vol.313, №10.— P.2167-79.
362. Schroder, R. Primary desminopathies / R. Schroder, A. Vrabie, H.H. Goebel // *J Cell Mol Med.* —2007.—Vol.11, №3.— P.416-26.
363. Sejersen, T. Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development / T. Sejersen, U. Lendahl // *J Cell Sci.* —1993.— Vol.106 ( Pt 4), 1291-300.
364. Selcen, D. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy / D. Selcen, F. Muntoni, B.K. Burton, [et al.] // *Ann Neurol.* —2009.— Vol.65, №1.— P.83-9.
365. Semmler, A. Unusual multisystemic involvement and a novel BAG3 mutation revealed by NGS screening in a large cohort of myofibrillar myopathies / A.L. Semmler, S. Sacconi, J.E. Bach, [et al.] // *Orphanet J Rare Dis.* —2014.—Vol.9, 121.

366. Senni, M. Predicting heart failure outcome from cardiac and comorbid conditions: the 3C-HF score / M. Senni, P. Parrella, R. De Maria, [et al.] // *Int J Cardiol.* — 2013.—Vol.163, №2.— P.206-11.
367. Sequeira, V. The Frank-Starling Law: a jigsaw of titin proportions / V. Sequeira, J. van der Velden // *Biophys Rev.* —2017.—Vol.9, №3.— P.259-67.
368. Singh, T. Current outcomes in US children with cardiomyopathy listed for heart transplantation / T.P. Singh, C.S. Almond, G. Piercey, [et al.] // *Circ Heart Fail.* — 2012.—Vol.5, №5.— P.594-601.
369. Sjoberg, G. A missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy, and exerts a dominant negative effect on filament formation / G. Sjoberg, C.A. Saavedra-Matiz, D.R. Rosen, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —1999.—Vol.8, №12.— P.2191-8.
370. Smillie, L. Preparation and identification of alpha- and beta-tropomyosins / L.B. Smillie // *Methods Enzymol.* —1982.—Vol.85 Pt B, 234-41.
371. Smith, N. 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.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2010.—Vol.3, №3.— P.256-66.
372. Smolina, N. Aggregate-prone desmin mutations impair mitochondrial calcium uptake in primary myotubes / N. Smolina, J. Bruton, G. Sjoberg, [et al.] // *Cell Calcium.* —2014.—Vol.56, №4.— P.269-75.
373. Snyder, E. Genetics and pharmacogenetics in heart failure / E.M. Snyder, T.P. Olson, B.D. Johnson // *Curr Heart Fail Rep.* —2007.—Vol.4, №3.— P.139-44.
374. Solaro, R. Remote control of A-band cardiac thin filaments by the I-Z-I protein network of cardiac sarcomeres / R.J. Solaro // *Trends Cardiovasc Med.* —2005.—Vol.15, №4.— P.148-52.
375. Solaro, R. Integration of troponin I phosphorylation with cardiac regulatory networks / R.J. Solaro, M. Henze, T. Kobayashi // *Circ Res.* —2013.—Vol.112, №2.— P.355-66.
376. Solzin, J. Kinetic mechanism of the Ca<sup>2+</sup>-dependent switch-on and switch-off of cardiac troponin in myofibrils / J. Solzin, B. Iorga, E. Sierakowski, [et al.] // *Biophys J.* —2007.—Vol.93, №11.— P.3917-31.
377. Srivastava, A. Association of 25 bp deletion in MYBPC3 gene with left ventricle dysfunction in coronary artery disease patients / A. Srivastava, N. Garg, T. Mittal, [et al.] // *PLoS One.* —2011.—Vol.6, №9.— P.e24123.
378. Stark, K. Genetic association study identifies HSPB7 as a risk gene for idiopathic dilated cardiomyopathy / K. Stark, U.B. Esslinger, W. Reinhard, [et al.] // *PLoS Genet.* —2010.—Vol.6, №10.— P.e1001167.
379. Streckfuss-Bomeke, K. Severe DCM phenotype of patient harboring RBM20 mutation S635A can be modeled by patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes / K. Streckfuss-Bomeke, M. Tiburcy, A. Fomin, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2017.—Vol.113, 9-21.

380. Su, M. Rare variants in genes encoding MuRF1 and MuRF2 are modifiers of hypertrophic cardiomyopathy / M. Su, J. Wang, L. Kang, [et al.] // *Int J Mol Sci.* —2014.—Vol.15, №6.— P.9302-13.
381. Suzuki-Hatano, S. AAV9-TAZ Gene Replacement Ameliorates Cardiac TMT Proteomic Profiles in a Mouse Model of Barth Syndrome / S. Suzuki-Hatano, M. Saha, M.S. Soustek, [et al.] // *Mol Ther Methods Clin Dev.* —2019.—Vol.13, 167-79.
382. Szczerbal, I. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system / I. Szczerbal, H.A. Foster, J.M. Bridger // *Chromosoma.* —2009.—Vol.118, №5.— P.647-63.
383. Szczesna, D. Altered regulation of cardiac muscle contraction by troponin T mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy / D. Szczesna, R. Zhang, J. Zhao, [et al.] // *J Biol Chem.* —2000.—Vol.275, №1.— P.624-30.
384. Takahashi-Yanaga, F. Functional consequences of the mutations in human cardiac troponin I gene found in familial hypertrophic cardiomyopathy / F. Takahashi-Yanaga, S. Morimoto, K. Harada, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2001.—Vol.33, №12.— P.2095-107.
385. Takeda, N. Cardiomyopathy: molecular and immunological aspects (review) / N. Takeda // *Int J Mol Med.* —2003.—Vol.11, №1.— P.13-6.
386. Tao, S. Serum lipids and their correlates in Chinese urban and rural populations of Beijing and Guangzhou. PRC-USA Cardiovascular and Cardiopulmonary Epidemiology Research Group / S. Tao, Y. Li, Z. Xiao, [et al.] // *Int J Epidemiol.* —1992.—Vol.21, №5.— P.893-903.
387. Tarnovskaya, S. Structural consequences of mutations associated with idiopathic restrictive cardiomyopathy / S. Tarnovskaya, A. Kiselev, A. Kostareva, [et al.] // *Amino Acids.* —2017.—Vol.49, №11.— P.1815-29.
388. Tasca, G. Novel FLNC mutation in a patient with myofibrillar myopathy in combination with late-onset cerebellar ataxia / G. Tasca, Z. Odgerel, M. Monforte, [et al.] // *Muscle Nerve.* —2012.—Vol.46, №2.— P.275-82.
389. Taylor, M. Prevalence of desmin mutations in dilated cardiomyopathy / M.R. Taylor, D. Slavov, L. Ku, [et al.] // *Circulation.* —2007.—Vol.115, №10.— P.1244-51.
390. Thornell, L. Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy / L. Thornell, L. Carlsson, Z. Li, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —1997.—Vol.29, №8.— P.2107-24.
391. Tilgner, K. Dynamic complexes of A-type lamins and emerin influence adipogenic capacity of the cell via nucleocytoplasmic distribution of beta-catenin / K. Tilgner, K. Wojciechowicz, C. Jahoda, [et al.] // *J Cell Sci.* —2009.—Vol.122, №Pt 3.— P.401-13.
392. Tkatchenko, A. Identification of altered gene expression in skeletal muscles from Duchenne muscular dystrophy patients / A.V. Tkatchenko, G. Pietu, N. Cros, [et al.] // *Neuromuscul Disord.* —2001.—Vol.11, №3.— P.269-77.

393. Toepfer, C. Myosin regulatory light chain (RLC) phosphorylation change as a modulator of cardiac muscle contraction in disease / C. Toepfer, V. Caorsi, T. Kampourakis, [et al.] // *J Biol Chem.* —2013.—Vol.288, №19.— P.13446-54.
394. Toepfer, C. A post-MI power struggle: adaptations in cardiac power occur at the sarcomere level alongside MyBP-C and RLC phosphorylation / C.N. Toepfer, M.B. Sikkel, V. Caorsi, [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* —2016.— Vol.311, №2.— P.H465-75.
395. Topilsky, Y. Left ventricular assist device therapy in patients with restrictive and hypertrophic cardiomyopathy / Y. Topilsky, N.L. Pereira, D.K. Shah, [et al.] // *Circ Heart Fail.* —2011.—Vol.4, №3.— P.266-75.
396. Towbin, J. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus / J.A. Towbin, J.F. Hejtmancik, P. Brink, [et al.] // *Circulation.* —1993.—Vol.87, №6.— P.1854-65.
397. Towbin, J. Incidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children / J.A. Towbin, A.M. Lowe, S.D. Colan, [et al.] // *JAMA.* —2006.—Vol.296, №15.— P.1867-76.
398. Truszkowska, G. Homozygous truncating mutation in NRAP gene identified by whole exome sequencing in a patient with dilated cardiomyopathy / G.T. Truszkowska, Z.T. Bilinska, A. Muchowicz, [et al.] // *Sci Rep.* —2017.—Vol.7, №1.— P.3362.
399. Tucker, N. Novel Mutation in FLNC (Filamin C) Causes Familial Restrictive Cardiomyopathy / N.R. Tucker, M.A. McLellan, D. Hu, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2017.—Vol.10, №6.— P.
400. Vadrot, N. The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy / N. Vadrot, I. Duband-Goulet, E. Cabet, [et al.] // *Hum Mol Genet.* —2014.—Vol.
401. Valdes-Mas, R. Mutations in filamin C cause a new form of familial hypertrophic cardiomyopathy / R. Valdes-Mas, A. Gutierrez-Fernandez, J. Gomez, [et al.] // *Nat Commun.* —2014.—Vol.5, 5326.
402. van Berlo, J. Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? / J.H. van Berlo, W.G. de Voogt, A.J. van der Kooi, [et al.] // *J Mol Med (Berl).* — 2005.—Vol.83, №1.— P.79-83.
403. van den Bogaart, F. Widening the spectrum of filamin-C myopathy: Predominantly proximal myopathy due to the p.A193T mutation in the actin-binding domain of FLNC / F.J. van den Bogaart, K.G. Claeys, R.A. Kley, [et al.] // *Neuromuscul Disord.* —2017.—Vol.27, №1.— P.73-7.
404. van Spaendonck-Zwarts, K. Desmin-related myopathy / K.Y. van Spaendonck-Zwarts, L. van Hessem, J.D. Jongbloed, [et al.] // *Clin Genet.* —2011.—Vol.80, №4.— P.354-66.
405. van Tintelen, J. High yield of LMNA mutations in patients with dilated cardiomyopathy and/or conduction disease referred to cardiogenetics outpatient clinics / J.P. van Tintelen, R.M. Hofstra, H. Katerberg, [et al.] // *Am Heart J.* — 2007.—Vol.154, №6.— P.1130-9.

406. van Tintelen, J. Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene / J.P. van Tintelen, I.C. Van Gelder, A. Asimaki, [et al.] // *Heart Rhythm*. —2009.—Vol.6, №11.— P.1574-83.
407. van Waning, J. Genetics, Clinical Features, and Long-Term Outcome of Noncompaction Cardiomyopathy / J.I. van Waning, K. Caliskan, Y.M. Hoedemaekers, [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. —2018.—Vol.71, №7.— P.711-22.
408. Vatta, M. Mutations in Cypher/ZASP in patients with dilated cardiomyopathy and left ventricular non-compaction / M. Vatta, B. Mohapatra, S. Jimenez, [et al.] // *J Am Coll Cardiol*. —2003.—Vol.42, №11.— P.2014-27.
409. Vazquez, R. The MUSIC Risk score: a simple method for predicting mortality in ambulatory patients with chronic heart failure / R. Vazquez, A. Bayes-Genis, I. Cygankiewicz, [et al.] // *Eur Heart J*. —2009.—Vol.30, №9.— P.1088-96.
410. Venkatraman, G. Different functional properties of troponin T mutants that cause dilated cardiomyopathy / G. Venkatraman, K. Harada, A.V. Gomes, [et al.] // *J Biol Chem*. —2003.—Vol.278, №43.— P.41670-6.
411. Verstraeten, V. The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression / V.L. Verstraeten, J.L. Broers, F.C. Ramaekers, [et al.] // *Current medicinal chemistry*. —2007.—Vol.14, №11.— P.1231-48.
412. Vicart, P. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy / P. Vicart, A. Caron, P. Guicheney, [et al.] // *Nat Genet*. —1998.—Vol.20, №1.— P.92-5.
413. 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.] // *Eur Heart J*. —2011.—Vol.32, №9.— P.1065-76.
414. Vorgerd, M. A mutation in the dimerization domain of filamin c causes a novel type of autosomal dominant myofibrillar myopathy / M. Vorgerd, P.F. van der Ven, V. Bruchertseifer, [et al.] // *Am J Hum Genet*. —2005.—Vol.77, №2.— P.297-304.
415. Vrabie, A. The enlarging spectrum of desminopathies: new morphological findings, eastward geographic spread, novel exon 3 desmin mutation / A. Vrabie, L.G. Goldfarb, A. Shatunov, [et al.] // *Acta Neuropathol*. —2005.—Vol.109, №4.— P.411-7.
416. Wang, J. Malignant effects of multiple rare variants in sarcomere genes on the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy / J. Wang, Y. Wang, Y. Zou, [et al.] // *Eur J Heart Fail*. —2014.—Vol.16, №9.— P.950-7.
417. Wang, Q. The CMYA5 gene confers risk for both schizophrenia and major depressive disorder in the Han Chinese population / Q. Wang, K. He, Z. Li, [et al.] // *World J Biol Psychiatry*. —2014.—Vol.15, №7.— P.553-60.
418. Wang, S. Role of desmin filaments in chicken cardiac myofibrillogenesis / S.M. Wang, Y.S. Huang, J.C. Wu, [et al.] // *J Cell Biochem*. —2000.—Vol.77, №4.— P.635-44.
419. Wang, X. Mouse model of desmin-related cardiomyopathy / X. Wang, H. Osinska, G.W. Dorn, 2nd, [et al.] // *Circulation*. —2001.—Vol.103, №19.— P.2402-7.



420. Wang, X. Associations of lipid levels susceptibility loci with coronary artery disease in Chinese population / X.B. Wang, Y.D. Han, N.H. Cui, [et al.] // *Lipids Health Dis.* —2015.—Vol.14, 80.
421. Ware, J. Shared Genetic Predisposition in Peripartum and Dilated Cardiomyopathies / J.S. Ware, J. Li, E. Mazaika, [et al.] // *N Engl J Med.* —2016.—Vol.374, №3.— P.233-41.
422. Watanabe, Y. The cardiomyopathy-associated 5 (CMYA5) gene and risk of schizophrenia: meta-analysis of rs3828611 and rs4704591 in East Asian populations / Y. Watanabe, M. Shibuya, T. Someya // *Asian J Psychiatr.* —2014.—Vol.7, №1.— P.95-6.
423. Wattanapermpool, J. The unique amino-terminal peptide of cardiac troponin I regulates myofibrillar activity only when it is phosphorylated / J. Wattanapermpool, X. Guo, R.J. Solaro // *J Mol Cell Cardiol.* —1995.—Vol.27, №7.— P.1383-91.
424. Webber, S. Outcomes of restrictive cardiomyopathy in childhood and the influence of phenotype: a report from the Pediatric Cardiomyopathy Registry / S.A. Webber, S.E. Lipshultz, L.A. Sleeper, [et al.] // *Circulation.* —2012.—Vol.126, №10.— P.1237-44.
425. Weeland, C. Insights into alternative splicing of sarcomeric genes in the heart / C.J. Weeland, M.M. van den Hoogenhof, A. Beqqali, [et al.] // *J Mol Cell Cardiol.* —2015.—Vol.81, 107-13.
426. Wells, Q. Whole exome sequencing identifies a causal RBM20 mutation in a large pedigree with familial dilated cardiomyopathy / Q.S. Wells, J.R. Becker, Y.R. Su, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet.* —2013.—Vol.6, №4.— P.317-26.
427. Wen, Y. Functional consequences of the human cardiac troponin I hypertrophic cardiomyopathy mutation R145G in transgenic mice / Y. Wen, J.R. Pinto, A.V. Gomes, [et al.] // *J Biol Chem.* —2008.—Vol.283, №29.— P.20484-94.
428. Wessels, M. Mutations in sarcomeric protein genes not only lead to cardiomyopathy but also to congenital cardiovascular malformations / M.W. Wessels, P.J. Willems // *Clin Genet.* —2008.—Vol.74, №1.— P.16-9.
429. Wittekind, S. Contemporary Outcomes of Pediatric Restrictive Cardiomyopathy: A Single-Center Experience / S.G. Wittekind, T.D. Ryan, Z. Gao, [et al.] // *Pediatr Cardiol.* —2019.—Vol.40, №4.— P.694-704.
430. Wojtanik, K. The role of LMNA in adipose: a novel mouse model of lipodystrophy based on the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy mutation / K.M. Wojtanik, K. Edgemon, S. Viswanadha, [et al.] // *Journal of lipid research.* —2009.—Vol.50, №6.— P.1068-79.
431. Worman, H. Inner nuclear membrane and regulation of Smad-mediated signaling / H.J. Worman // *Biochim Biophys Acta.* —2006.—Vol.1761, №5-6.— P.626-31.
432. Wu, B. Myocardial contractile and metabolic properties of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac troponin I gene mutations: a simulation study / B. Wu, L. Wang, Q. Liu, [et al.] // *Exp Physiol.* —2012.—Vol.97, №1.— P.155-69.

433. Wu, C. Cardiac myosin binding protein C and MAP-kinase activating death domain-containing gene polymorphisms and diastolic heart failure / C.K. Wu, Y.T. Huang, J.K. Lee, [et al.] // *PLoS One*. —2012.—Vol.7, №4.— P.e35242.
434. Wyles, S. Modeling structural and functional deficiencies of RBM20 familial dilated cardiomyopathy using human induced pluripotent stem cells / S.P. Wyles, X. Li, S.C. Hrstka, [et al.] // *Hum Mol Genet*. —2016.—Vol.25, №2.— P.254-65.
435. Xia, X. A novel P20R mutation in the alpha-B crystallin gene causes autosomal dominant congenital posterior polar cataracts in a Chinese family / X.Y. Xia, Q.Y. Wu, L.M. An, [et al.] // *BMC Ophthalmol*. —2014.—Vol.14, 108.
436. Xue, Y. Exome Sequencing Identified a Splice Site Mutation in FHL1 that Causes Uruguay Syndrome, an X-Linked Disorder With Skeletal Muscle Hypertrophy and Premature Cardiac Death / Y. Xue, B. Schoser, A.R. Rao, [et al.] // *Circ Cardiovasc Genet*. —2016.—Vol.9, №2.— P.130-5.
437. Yang, S. Ventricular septal defect and restrictive cardiomyopathy in a paediatric TNNI3 mutation carrier / S.W. Yang, M.P. Hitz, G. Andelfinger // *Cardiol Young*. —2010.—Vol.20, №5.— P.574-6.
438. Zachara, E. Restrictive cardiomyopathy due to desmin accumulation in a family with evidence of autosomal dominant inheritance / E. Zachara, E. Bertini, E. Lioy, [et al.] // *G Ital Cardiol*. —1997.—Vol.27, №5.— P.436-42.
439. Zhang, J. Clinical and molecular studies of a large family with desmin-associated restrictive cardiomyopathy / J. Zhang, A. Kumar, H.J. Stalker, [et al.] // *Clin Genet*. —2001.—Vol.59, №4.— P.248-56.
440. Zhang, J. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects / J. Zhang, Q. Lian, G. Zhu, [et al.] // *Cell Stem Cell*. —2011.—Vol.8, №1.— P.31-45.
441. Zhang, Q. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity / Q. Zhang, C. Bethmann, N.F. Worth, [et al.] // *Hum Mol Genet*. —2007.—Vol.16, №23.— P.2816-33.
442. Zhang, R. Genetic analysis of common variants in the CMYA5 (cardiomyopathy-associated 5) gene with schizophrenia / R. Zhang, H. Zhang, M. Li, [et al.] // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. —2013.—Vol.46, 64-9.
443. Zhao, J. A novel nonsense mutation in LMNA gene identified by Exome Sequencing in an atrial fibrillation family / J. Zhao, H. Yao, Z. Li, [et al.] // *Eur J Med Genet*. —2016.—Vol.59, №8.— P.396-400.
444. Zhou, Q. Ablation of Cypher, a PDZ-LIM domain Z-line protein, causes a severe form of congenital myopathy / Q. Zhou, P.H. Chu, C. Huang, [et al.] // *J Cell Biol*. —2001.—Vol.155, №4.— P.605-12.
445. 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.] // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. —2017.—Vol.1863, №9.— P.2363-71.
446. Zile, M. Myocardial stiffness in patients with heart failure and a preserved ejection fraction: contributions of collagen and titin / M.R. Zile, C.F. Baicu, J.S. Ikonomidis, [et al.] // *Circulation*. —2015.—Vol.131, №14.— P.1247-59.