

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

Е.В. Дементьева^{1,2}, Ю.В. Вяткин³, Е.И. Кретов², Е.А. Елисафенко^{1,2},
С.П. Медведев^{1,2}, С.М. Закиан^{1,2}

Поступила: 15.04.2020

Принята к печати: 20.07.2020

Опубликована on-line: 15.12.2020

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр им. акад.

Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

GENETIC ANALYSIS OF PATIENTS WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY

E.V. Dementyeva^{1,2}, Yu.V. Vyatkin³, E.I. Kretov², E.A. Elisaphenko^{1,2}, S.P. Medvedev^{1,2}, S.M. Zakian^{1,2}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB of the RAS, Novosibirsk, Russia

² E.N. Meshalkin National Medical Research Center, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

e-mail: dementyeva@bionet.nsc.ru

Гипертрофическая кардиомиопатия является одной из наиболее распространенных сердечно-сосудистых патологий. В большинстве случаев заболевание обусловлено мутациями в генах, кодирующих саркомерные белки. Однако большая генетическая гетерогенность гипертрофической кардиомиопатии затрудняет интерпретацию результатов генетических исследований пациентов.

Цель настоящего исследования — проверить генетическую природу возникновения гипертрофической кардиомиопатии у 15 пациентов, страдающих данным заболеванием.

В результате генетического анализа только у 1 пациента была выявлена известная патогенная мутация p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3*, вызывающая гипертрофическую кардиомиопатию. У 6 пациентов в ассоциированных с гипертрофической кардиомиопатией генах *LDB3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2* и *MYPN* были обнаружены мутации с неясным клиническим значением. Для трех из этих мутаций: p.Ile730Asn в гене *LDB3*, p.Asn515del в гене *MYBPC3*, p.Arg955Trp в гене *MYPN* — ассоциация с гипертрофической кардиомиопатией была установлена впервые. У 2 пациентов были описаны новые мутации: p.Ser478Trp в гене *MYBPC3* и p.Asn989Ile в гене *MYPN*. Таким образом, еще у 8 пациентов возникновение гипертрофической кардиомиопатии также может быть связано с генетическими причинами, но роль этих мутаций в развитии заболевания еще только предстоит выяснить.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия, мутация, саркомерные белки.

Hypertrophic cardiomyopathy is one of the most common cardiovascular pathologies. In most cases, the disease is caused by mutations in genes encoding for sarcomeric proteins. However, high genetic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy makes it difficult to interpret results of patients' genetic studies.

The aim of this study is to check if hypertrophic cardiomyopathy in 15 patients suffering from the disease is due to genetic causes. In the course of genetic analysis, a known pathogenic mutation p.Gln1233Ter in *MYBPC3* causing hypertrophic cardiomyopathy was found only in one patient. In six patients, mutations with uncertain clinical significance were identified in hypertrophic cardiomyopathy-associated genes *LDB3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, and *MYPN*. Three of the mutations, p.Ile730Asn in *LDB3*, p.Asn515del in *MYBPC3*, p.Arg955Trp in *MYPN* were found for the first time in association with hypertrophic cardiomyopathy. In two patients, novel mutations, p.Ser478Trp in *MYBPC3* and p.Asn989Ile in *MYPN*, were identified. Thus, hypertrophic cardiomyopathy may be accounted for by genetic causes in 8 patients more but the role of these mutations in the disease development needs to be clarified.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy, mutation, sarcomeric proteins.

Введение

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) относится к распространенным сердечно-сосудистым заболеваниям с частотой встречаемости 1 случай на 500 человек. Для нее характерны аномальное утолщение стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки (толщина более 15 мм), диастолическая дисфункция, прогрессирующая сердечная недостаточность, повышенный риск аритмических событий [1, 2]. Частота ежегодной смертности из-за ГКМП составляет до 5–6% [3]. Более того, данное заболевание является частой причиной внезапной сердечной смерти среди молодых людей [4]. Несмотря на достаточно высокую частоту встречаемости, методы лечения, которые позволили бы предотвратить или остановить прогрессирование ГКМП, до сих пор не разработаны. Отсутствие эффективных методов терапии во многом объясняется тем, что патогенетические механизмы ГКМП недостаточно хорошо изучены. Известно, что до 60% случаев ГКМП являются наследственными и вызваны мутациями в генах, кодирующих преимущественно саркомерные белки [5]. Около 80% мутаций были обнаружены в генах

MYH7 и *MYBPC3*, кодирующих тяжелую цепь β -миозина и миозин-связывающий белок С. Примерно 12% случаев наследственной ГКМП обусловлены мутациями в генах *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*, кодирующих кардиальный тропонин Т, кардиальный тропонин I и α -тропомиозин [6]. В редких случаях вызывающие ГКМП мутации встречаются в генах, кодирующих другие белки сократительного аппарата саркомеров (*ACTC1*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*), белки Z-дисков (*ACTN2*, *ANKRD1*, *CSRP3*, *FLNC*, *LDB3*, *MYOZ2*, *NEXN*, *TCAP*, *VCL*), а также белки, ассоциированные с саркомерами (*DES*, *FHL1*) и участвующие в регуляции циркуляции ионов кальция (*CALR3*, *CASQ2*, *JPH2*, *PLN*). Кроме того, ГКМП может быть одним из проявлений некоторых метаболических и нейромышечных заболеваний, а также синдромов Нунан и LEOPARD [7].

Как правило, мутации, вызывающие ГКМП, имеют аутосомно-доминантный тип наследования. Большинство мутаций являются миссенс-мутациями, а делеции, инсерции и нонсенс-мутации были обнаружены, главным образом, в гене *MYBPC3* [5]. Следует отметить, что наличие патогенной мутации не всегда приводит к выраженным клиническим проявлениям

ГКМП, а носители одинаковых патогенных мутаций могут различаться возрастом клинической манифестации и степенью проявления заболевания [8, 9]. Генетическая гетерогенность ГКМП затрудняет интерпретацию результатов генетических исследований пациентов. Более того, благодаря внедрению высокопроизводительных методов секвенирования в клиническую практику происходит переоценка клинического значения ранее описанных генетических вариантов [10]. Также в результате генетического тестирования пациентов зачастую выявляют новые мутации в ассоциированных с ГКМП генах [11], роль которых в развитии ГКМП еще только предстоит установить. Все эти факторы на данный момент ограничивают возможности применения генетического тестирования для точной постановки диагноза, семейного анализа и прогнозирования течения заболевания.

Цель работы — изучение генетической природы ГКМП у 15 пациентов, страдающих данным заболеванием. Генетический анализ пациентов был выполнен посредством массового параллельного секвенирования их клинического экзота (экзонов 5300 клинически значимых генов) с последующим подтверждением мутаций в генах, ассоциированных с ГКМП, секвенированием по Сэнгеру.

Материал и методы

В исследование были включены 15 пациентов (9 мужчин и 6 женщин) в возрасте $52,8 \pm 16,4$ лет (от 20 лет до 71 года). Перед исследованием все пациенты подписывали добровольное информированное согласие. Характеристика пациентов представлена в таблице. Все пациенты имели обструктивную ГКМП. Средняя максимальная толщина межжелудочковой перегородки составляла $28,9 \pm 8,2$ мм (от 19,3 до 52 мм). У 11 пациентов была обнаружена выраженная хроническая сердечная недостаточность (ХСН) IIА стадии преимущественно с функциональным классом (ФК) III по NYHA, у 3 пациентов — начальная ХСН I стадии с ФК I-II. В клинической картине 4 пациентов были отмечены аритмические события: фибрилляции предсердий, пароксизмы желудочковой тахикардии, экстрасистолы; у 1 пациента — синкопе.

Из образцов крови пациентов выделяли мононуклеарные клетки центрифугированием в градиенте 1,077 г/мл фикола (Биолот, Россия). Геномную ДНК из мононуклеарных клеток крови выделяли с помощью Quick-DNA Miniprep Kit (Zymo Research, США) и использовали для массового параллельного секвенирования клинического экзота, которое выполняла компания «Генотек» на платформе HiSeq 2500 (Illumina, США). Для полученных в результате массового параллельного секвенирования прочтений были проведены контроль качества, очистка прочтений, а также картирование на геном человека с использованием инструмента BWA версии 0.7.17 (версия генома человека GRCh38). Поиск мутаций в генах осуществляли инструментом GATK версии 3.8.1.0 согласно рекомендованным разработчиками параметрам. На наличие мутаций были проверены гены, ассоциированные с ГКМП: *ACTC1*, *ACTN2*, *ANKRD1*, *CALR3*, *CASQ2*, *CAV3*, *CSRP3*, *DES*, *FHL1*, *FLNC*, *JPH2*, *LDB3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *MYLK2*, *MYOZ2*, *MYPN*, *NEXN*, *PLN*, *TCAP*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *TRIM63*, *VCL* [5]. Экзоны генов, содержащие мутации, были амплифицированы с помощью ПЦР, а полученные ПЦР-продукты были секвенированы по Сэнгеру в ЦКП «Геномика» СО РАН на секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, США). Анализ результатов секвенирования проводили с использованием программы CodonCode Aligner. Для *in silico* предсказания

влияния подтвержденных мутаций на структуру белков использовали следующие инструменты и базы данных: SIFT, PolyPhen2 HDIV, PolyPhen2 HVAR, LRT, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, PROVEAN, fathmm-MKL, MetaSVM, MetaLR.

Результаты

В ходе биоинформатического анализа результатов массового параллельного секвенирования клинического экзота 15 пациентов с ГКМП были выявлены 32 мутации в генах, ассоциированных с данным заболеванием. 16 мутаций (14 миссенс-мутаций, 1 нонсенс-мутация и 1 делеция) в генах *LDB3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYPN* были подтверждены с помощью секвенирования по Сэнгеру (табл.).

10 мутаций были обнаружены в гене *MYBPC3* (табл.). 7 миссенс-мутаций: полиморфизмы p.Val158Met (c.472G>A, пациенты HCM7, HCM15) и p.Ser236Gly (c.706A>G, пациенты HCM3, HCM5), а также мутации p.Val189Ile (c.565G>A, пациент HCM3) и p.Arg326Gln (c.977G>A, пациенты HCM11, HCM13) ранее были выявлены во многих генетических исследованиях пациентов с ГКМП [12–29]. *In silico* анализ (7–10 программ из 10) показал, что данные мутации и полиморфизмы не оказывают существенного влияния на структуру белка MYBPC3. Более того, частота встречаемости этих миссенс-мутаций в популяциях (0,28–10,79% согласно данным Exome Aggregation Consortium, ExAC) выше той, что характерна для патогенных мутаций. В связи с этим замены p.Val158Met, p.Val189Ile, p.Ser236Gly, p.Arg326Gln в гене *MYBPC3* классифицируются как нейтральные (benign/likely benign в базе данных ClinVar, NCBI). У пациента HCM7 в гене *MYBPC3* вместе с полиморфизмом p.Val158Met впервые была выявлена мутация p.Ser478Trp (c.1433C>G), клиническое значение которой в настоящее время не известно. По результатам *in silico* анализа (9 программ из 10) можно предположить, что мутация p.Ser478Trp негативно влияет на структуру белка MYBPC3 и может стать причиной развития заболевания. У пациента HCM13, помимо мутации p.Arg326Gln, в гене *MYBPC3* была также обнаружена нонсенс-мутация p.Gln1233Ter (c.3697C>T), которая приводит к преждевременному появлению стоп-кодона, синтезу укороченного варианта белка MYBPC3 и потере миозин-связывающего домена. Только две из использованных для *in silico* анализа программ (MutationTaster, fathmm-MKL) могли предсказать эффект этой мутации, и в обоих случаях она оценивалась как способная вызвать заболевание. Для мутации p.Gln1233Ter была показана ассоциация с ГКМП как при исследовании индивидуальных пациентов, так и при семейном анализе [16, 27, 29–34]. В пользу патогенности данной мутации свидетельствуют низкая частота встречаемости (0,001% согласно ExAC), а также тот факт, что нонсенс-мутации в гене *MYBPC3* ассоциированы с ГКМП [35]. Таким образом, мутация p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3* классифицируется как патогенная (pathogenic/likely pathogenic в ClinVar). Кроме того, у пациента HCM14 в гене *MYBPC3* была выявлена мутация p.Asn515del (c.1543_1545del), приводящая к делеции одной аминокислоты и не нарушающая рамку считывания. Программы для *in silico* анализа не позволяют оценить влияние делеций. Мутация p.Asn515del ранее была обнаружена у пациента с дилатационной кардиомиопатией [36]. Известно также, что делеции аминокислотных остатков в белке MYBPC3 ассоциированы с кардиомиопатией [35]. Имеющихся данных пока недостаточно, чтобы определить клиническое значение мутации p.Asn515del в гене *MYBPC3* (uncertain significance в ClinVar).

Еще одним геном, где вызывающие ГКМП мутации встречаются наиболее часто, является ген *MYH7*. В этом гене была обнаружена лишь одна миссенс-мутация — p.Met659Ile (с.1977G>A, пациент HCM1) (табл.). Мутация локализуется в актин-связывающем районе моторного домена миозина. До настоящего момента она была обнаружена лишь в одном генетическом исследовании пациентов с ГКМП [18], и ее клиническое значение пока не известно (мутация отсутствует в ClinVar). In silico анализ (9 программ из 10) показывает, что мутация p.Met659Ile нарушает структуру белка MYH7 и может быть патогенной.

Три миссенс-мутации: p.Arg955Trp (с.2863C>T, пациент HCM3), p.Asn989Ile (с.2966A>T, пациент HCM12), p.Pro1112Leu (с.3335C>T, пациент HCM9) — были выявлены в гене *MYPN*, кодирующем саркомерный белок — миопалладин (табл.). Мутация p.Arg955Trp (пациент HCM3) локализуется в α -актинин-связывающем районе белка MYPN. Результаты in silico анализа не однозначны: 7 программ указывают на то, что мутация p.Arg955Trp нарушает структуру белка MYPN, в то время как 4 программы оценивают ее как безвредную. Прежде данная мутация была обнаружена у пациента с дилатационной кардиомиопатией [37], пациента с синдромом некомпактного миокарда левого желудочка [38] и пациента с внезапной сердечной смертью [39]. Однако иммуногистохимический анализ эндомикардиальной биопсии показал нормальное распределение миопалладина и α -актинина в кардиомиоцитах носителя мутации p.Arg955Trp [37]. Таким образом, данные по клиническому значению этой мутации противоречивы (uncertain significance/likely benign в ClinVar). Мутация p.Asn989Ile (пациент HCM12) была найдена впервые, в связи с этим ее клиническое значение еще не установлено. In silico анализ этой мутации (8 программ из 11) предполагает, что она нарушает структуру белка MYPN и может оказаться причиной развития заболевания. Мутация p.Pro1112Leu (пациент HCM9) была выявлена в генетических исследованиях пациентов с ГКМП [40, 41] и дилатационной кардиомиопатией [42]. Данные in silico анализа противоречивы: 6 программ указывают на негативное влияние мутации на структуру белка и 5 программ — на безвредность мутации. Эксперименты по трансфекции кДНК гена *MYPN* в неонатальные кардиомиоциты крысы показали, что присутствие белка MYPN с мутацией p.Pro1112Leu нарушало саркомерную организацию и снижало жизнеспособность кардиомиоцитов [42]. Однако частота встречаемости данной мутации выше, чем частота встречаемости, свойственная патогенным мутациям (0,3% согласно ExAC). Неоднозначность полученных данных пока не позволяет оценить клиническое значение мутации p.Pro1112Leu в гене *MYPN* (benign/likely benign/uncertain significance в ClinVar).

Две оставшиеся миссенс-мутации были обнаружены в генах *MYL2* и *LDB3*, кодирующих регуляторную легкую цепь β -миозина и LIM домен-связывающий белок 3 (табл.). Мутация p.Arg40Lys (с.119G>A, пациент HCM10) приходится на эволюционно консервативный район белка MYL2 (кальций-связывающий домен EF-hand1). Тем не менее in silico анализ (7 программ из 11) определяет эту мутацию как безвредную. Данная мутация встречается с очень низкой частотой (нет данных в ExAC) и была ранее выявлена у нескольких пациентов с ГКМП [43]. Таким образом, информация по данной мутации не позволяет сделать четкого заключения о ее клиническом значении (uncertain significance в ClinVar). Мутация p.Ile730Asn (с.2189T>A, пациент HCM2) в гене *LDB3* была выявлена у пациентов с синдромом некомпактного миокарда левого желудочка [38] и конечностно-поясной мышечной

дистрофией [44]. In silico анализ не вносит ясности: 6 программ определяют данную мутацию как нарушающую структуру белка LDB3 и 4 программы — как безвредную. Клиническое значение мутации p.Ile730Asn в гене *LDB3* пока не установлено (uncertain significance, ClinVar).

Обсуждение

Проведенный нами генетический анализ 15 пациентов с ГКМП подтвердил существующие сложности с интерпретацией результатов генетических исследований данного заболевания. Несмотря на то что мутации в ассоциированных с ГКМП генах были выявлены у 12 пациентов, только у 1 пациента результаты генетического анализа однозначно согласуются с поставленным диагнозом.

У пациента HCM13 была диагностирована выраженная асимметричная гипертрофия стенок левого желудочка, сопровождающаяся гипертрофией головок папиллярных мышц, умеренной митральной недостаточностью, расширенной полостью левого предсердия, ХСН I стадии с ФК I-II, признаками SAM-синдрома и преходящей атриовентрикулярной блокадой 3 степени. При генетическом анализе данного пациента была обнаружена ранее описанная патогенная мутация p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3* (табл.), ассоциация которой с ГКМП была подтверждена в ходе многочисленных генетических исследований [16, 27, 29–34]. Наличие патогенной мутации, значительная гипертрофия миокарда левого желудочка (толщина межжелудочковой перегородки составляла 48–52 мм) и молодой возраст выявления ГКМП (24 года) предполагают дальнейшее неблагоприятное течение заболевания.

У двух пациентов (HCM9 и HCM10) были найдены мутации с неясным клиническим значением (табл.), которые прежде уже обнаруживали в ассоциации с ГКМП [40, 41, 43]. Обструктивная ГКМП у пациентов HCM9 и HCM10 сопровождалась митральной недостаточностью, выраженной ХСН (IIA стадии с ФК II-III). У пациента HCM9 также были отмечены пароксизмальная форма фибрилляции предсердий и желудочковые экстрасистолы. Пациент HCM9 является носителем мутации p.Pro1112Leu в гене *MYPN*, а пациент HCM10 — мутации p.Arg40Lys в гене *MYL2*. Однако данные in silico анализа (для обеих мутаций), а также высокая частота встречаемости (для мутации p.Pro1112Leu в гене *MYPN*) ставят под сомнение патогенность этих мутаций.

В данном исследовании впервые у пациентов с ГКМП были найдены три мутации: p.Ile730Asn в гене *LDB3* (пациент HCM2), p.Arg955Trp (пациент HCM3) и p.Asn515del в гене *MYBPC3* (пациент HCM14) (табл.). Пациенты различались по клинической картине проявления ГКМП. У пациента HCM2 были отмечены умеренная гипертрофия миокарда левого желудочка, выраженная ХСН IIA стадии с ФК III и пароксизмальная форма фибрилляции предсердий. Пациенты HCM3 и HCM14, напротив, имели выраженную гипертрофию миокарда левого желудочка, а степень ХСН варьировала (I-IIA стадии с ФК I-III). До сегодняшнего дня мутации p.Ile730Asn в гене *LDB3*, p.Arg955Trp в гене *MYPN* и p.Asn515del в гене *MYBPC3* обнаруживали при генетическом тестировании пациентов с другими типами кардиомиопатии: дилатационной кардиомиопатией и синдромом некомпактного миокарда левого желудочка [36–38]. В данном факте нет противоречий, поскольку ранее было показано, что одинаковые мутации могут вызывать как ГКМП, так и дилатационную кардиомиопатию даже у членов одной семьи [45]. Более того, этот результат

Таблица. Характеристика пациентов с ГКМП и результаты их генетического анализа

Пациент	Пол, возраст	Клиническая картина	Мутация/ SNP	Ген	Клиническое значение *
HCM1	М, 38	ГКМП со стенозированием выходного отдела левого желудочка, МЖП=29–30 мм; умеренная недостаточность митрального клапана; коронарный атеросклероз; артериальная гипертония III ст., риск 4; ХСН IIA ст. ФК II-III	p.Met659Ile	<i>MYH7</i>	Нет данных
HCM2	М, 66	Обструктивная ГКМП, МЖП до 19,3 мм; выраженная митральная недостаточность; ИБС: стенокардия напряжения ФК II; гипертоническая болезнь III ст., III степени, риск 4; ХСН IIA ст. ФК III; пароксизмальная форма фибрилляции предсердий	p.Ile730Asn	<i>LDB3</i>	Неясное значение
HCM3	Ж, 55	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка, МЖП до 28,1 мм; ХСН I ст. ФК I	p.Val189Ile	<i>MYBPC3</i>	Нейтральная мутация
			p.Ser236Gly		Нейтральный полиморфизм
			p.Arg955Trp	<i>MYPN</i>	Данные противоречивы
HCM4	М, 55	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка; умеренный аортальный стеноз; умеренная митральная недостаточность; ХСН ФК II	—	—	—
HCM5	Ж, 41	Обструктивная ГКМП; незначительная митральная недостаточность; пароксизмальная форма фибрилляции предсердий; неустойчивые пароксизмы желудочковой тахикардии; наджелудочковая экстрасистолия; ХСН IIA ст. ФК III	p.Ser236Gly	<i>MYBPC3</i>	Нейтральный полиморфизм
HCM6	Ж, 64	Обструктивная ГКМП, МЖП до 25 мм; умеренная митральная недостаточность; ИБС: стенокардия напряжения ФК III; ХСН IIA ст. ФК III	—	—	—
HCM7	М, 59	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка, МЖП до 28,8 мм; умеренная недостаточность митрального клапана; гипертоническая болезнь III ст., III степени, риск 4; ХСН IIA ст. ФК III	p.Val158Met	<i>MYBPC3</i>	Нейтральный полиморфизм
			p.Ser478Trp		Нет данных
HCM8	М, 55	Обструктивная ГКМП, МЖП до 27–28 мм; выраженная недостаточность митрального клапана; артериальная гипертония II ст., риск 4; ХСН IIA ст. ФК III	—	—	—
HCM9	М, 68	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка; умеренная недостаточность митрального клапана; пароксизмальная форма фибрилляции предсердий; желудочковая экстрасистолия; ХСН IIA ст. ФК III	p.Pro1112Leu	<i>MYPN</i>	Данные противоречивы
HCM10	М, 20	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка, МЖП до 25,9–26,9 мм; выраженная митральная недостаточность; ХСН IIA ст. ФК II	p.Arg40Lys	<i>MYL2</i>	Неясное значение
HCM11	М, 41	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка; умеренная митральная недостаточность; артериальная гипертония II ст., риск 3; синкопе; ХСН I ст. ФК II	p.Arg326Gln	<i>MYBPC3</i>	Нейтральная мутация
HCM12	Ж, 71	ГКМП с обструкцией выходного отдела левого желудочка, МЖП до 22–25 мм; гипертоническая болезнь III ст., III степени, риск 4; ХСН IIA ст. ФК III	p.Asn989Ile	<i>MYPN</i>	Нет данных
HCM13	М, 24	ГКМП с обструкцией выходного тракта левого желудочка, МЖП=48–52 мм; умеренная митральная недостаточность; преходящая атриовентрикулярная блокада III степени; ХСН I ст. ФК I-II	p.Arg326Gln	<i>MYBPC3</i>	Нейтральная мутация
			p.Gln1233Ter		Патогенная мутация

Пациент	Пол, возраст	Клиническая картина	Мутация/ SNP	Ген	Клиническое значение*
HCM14	Ж, 65	ГКМП: асимметричная гипертрофия межжелудочковой перегородки с обструкцией выносящего тракта левого желудочка, МЖП до 27 мм; выраженная митральная недостаточность; ХСН IIA ст. ФК III	p.Asn515del	MYBPC3	Неясное значение
HCM15	Ж, 70	Обструктивная ГКМП, МЖП=26–27,7 мм; умеренная недостаточность митрального клапана; артериальная гипертензия III ст., риск 4; пароксизмальная форма фибрилляции предсердий; ХСН IIA ст. ФК III	p.Val158Met	MYBPC3	Нейтральный полиморфизм

Примечание: * Клиническое значение выявленных мутаций и полиморфизмов указано, согласно критериям ACMG2015, и взято из базы данных ClinVar (NCBI); ИБС — ишемическая болезнь сердца; МЖП — межжелудочковая перегородка; ФК — функциональный класс, для ХСН указан согласно классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (New York Heart Association, NYHA); ХСН — хроническая сердечная недостаточность

предполагает, что механизмы развития кардиомиопатий могут быть гораздо сложнее, чем считалось ранее. Мутации в генах саркомерных белков, вероятно, лишь запускают патологический процесс, а его дальнейшее развитие будет определяться дополнительными механизмами, включающими влияние мутаций в других генах и негенетических факторов (например, эпигенетических, пост-транскрипционных и пост-трансляционных механизмов) [46]. Тем не менее способность мутаций p.Ile730Asn в гене *LDB3*, p.Arg955Trp в гене *MYPN* и p.Asn515del в гене *MYBPC3* запускать патологические процессы нуждается в подтверждении, так как несоответствие между данными генетических исследований, результатами *in silico* анализа и единичных функциональных исследований пока не позволяет однозначно установить клиническое значение этих мутаций.

В результате проведенного исследования были найдены три мутации, которые в настоящее время отсутствуют в базе данных ClinVar (табл.). Если мутация p.Met659Ile в гене *MYH7* (пациент HCM1) ранее была обнаружена в ассоциации с ГКМП в одном исследовании [18], то мутации p.Ser478Trp в гене *MYBPC3* (пациент HCM7) и p.Asn989Ile в гене *MYPN* (пациент HCM12) были описаны впервые. Носители этих мутаций имели выраженную гипертрофию миокарда левого желудочка, выраженную ХСН (IIA стадии с ФК II-III) и SAM-синдром. Результаты *in silico* анализа указывают на то, что эти мутации могут быть патогенными. Однако роль мутаций p.Met659Ile в гене *MYH7*, p.Ser478Trp в гене *MYBPC3* и p.Asn989Ile в гене *MYPN* в патогенезе ГКМП еще только предстоит выяснить.

Три пациента (пациенты HCM5, HCM11 и HCM15) являлись носителями нейтральных мутаций и полиморфизмов в гене *MYBPC3*. Еще у трех пациентов (пациенты HCM4, HCM6 и HCM8) мутации и полиморфизмы в ассоциированных с ГКМП генах не были обнаружены (табл.). Следует отметить, что для клинической картины пациентов с нейтральными мутациями и полиморфизмами в гене *MYBPC3* были характерны аритмические события: фибрилляции предсердий (пациенты HCM5 и HCM15), синкопе (пациент HCM11), желудочковые тахикардии и экстрасистолы (пациент HCM5). Особый интерес в этой группе представляет пациент HCM5, поскольку его отец умер в 43 года от ГКМП, что указывает на семейную форму заболевания. Помимо аритмических событий, для клинической картины пациента HCM5 были характерны выраженная гипертрофия миокарда левого желудочка, ХСН (IIA стадии с ФК III), гипертрофия стенок правого

желудочка и расширение полостей обоих предсердий. Наличие семейного анамнеза предполагает, что пациент HCM5 может быть носителем патогенной мутации, которая находится в некодирующих частях исследованных генов [47], или генах, мутации в которых приводят к развитию ГКМП в очень редких (единичных) случаях. Предположение о наличии редкой мутации, вызывающей ГКМП, также может быть справедливым и для пациентов HCM4, HCM6, HCM8, HCM11 и HCM15, хотя они и не имеют родственников с ГКМП. Развитие заболевания у этих пациентов также может быть обусловлено и другими факторами, поскольку на сегодняшний день до 40% случаев ГКМП не удается объяснить генетическими причинами [48].

Таким образом, из 15 пациентов с ГКМП только у одного диагноз был подтвержден результатами молекулярно-генетических исследований. У 8 пациентов были обнаружены мутации в ассоциированных с ГКМП генах *LDB3*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYPN*, но их клиническое значение в силу различных причин на данный момент остается неясным. В связи с этим дальнейшие исследования должны быть направлены на выяснение способности этих мутаций запускать развитие ГКМП, а также механизма их действия. Наиболее перспективным подходом для решения этой задачи может стать получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с последующей направленной дифференцировкой в кардиомиоциты и применение методов редактирования генов (система CRISPR/Cas). Такой подход позволяет получать кардиомиоциты, которые имеют одинаковый генетический фон и различаются лишь наличием конкретной мутации, что дает возможность оценить участие этой мутации в развитии патологического фенотипа [49]. Кроме того, кардиомиоциты, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с ГКМП, могут быть использованы для изучения молекулярных механизмов действия мутаций и разработки новых стратегий в терапии данного заболевания [50, 51].

Благодарности

Работа выполнена в ИЦиГ СО РАН и поддержана грантом РФФИ № 18-75-10039. Анализ данных массового параллельного секвенирования и подтвержденных мутаций проведен совместно с Ю.В. Вяткиным (НГУ). НМИЦ им. акад. Е.Н. Мешалкина были предоставлены образцы крови и клинические данные пациентов с ГКМП.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

1. Maron B.J. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002; 287(10): 1308–20.
2. Elliott P.M., Anastasakis A., Borger M.A. et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the task force for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* 2014; 35(39): 2733–79.
3. Houston B.A., Stevens G.R. Hypertrophic cardiomyopathy: a review. *Clin. Med. Insights Cardiol.* 2015; 8 Suppl 1: 53–65.
4. Maron B.J., Gardin J.M., Flack J.M. et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA study. Coronary artery risk development in (young) adults. *Circulation* 1995; 92(4): 785–9.
5. Marian A.J., Braunwald E. Hypertrophic cardiomyopathy: genetics, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and therapy. *Circ. Res.* 2017; 121(7): 749–70.
6. Pasipoularides A. Challenges and controversies in hypertrophic cardiomyopathy: clinical, genomic and basic science perspectives. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed.)* 2018; 71(3): 132–8.
7. Akhtar M., Elliott P. The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2018; 2018(3): 36.
8. Van Driest S.L., Ackerman M.J., Ommen S.R. et al. Prevalence and severity of “benign” mutations in the beta-myosin heavy chain, cardiac troponin T, and alpha-tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002; 106(24): 3085–90.
9. Oliva-Sandoval M.J., Ruiz-Espejo F., Monserrat L. et al. Insights into genotype-phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy. Findings from 18 Spanish families with a single mutation in MYBPC3. *Heart* 2010; 96(24): 1980–4.
10. Walsh R., Thomson K.L., Ware J.S. et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet. Med.* 2017; 19(2): 192–203.
11. Maron B.J., Maron M.S., Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012; 60(8): 705–15.
12. Maron B.J., Niiimura H., Casey S.A. et al. Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38(2): 315–21.
13. Jaaskelainen P., Kuusisto J., Miettinen R. et al. Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2002; 80(7): 412–22.
14. Niiimura H., Patton K.K., McKenna W.J. et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105(4): 446–51.
15. Alders M., Jongbloed R., Deelen W. et al. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur. Heart J.* 2003; 24(20): 1848–53.
16. Erdmann J., Daehmlow S., Wischke S. et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin. Genet.* 2003; 64(4): 339–49.
17. Morner S., Richard P., Kazzam E. et al. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2003; 35(7): 841–9.
18. Richard P., Charron P., Carrier L. et al. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003; 107(17): 2227–32.
19. Hayashi T., Arimura T., Itoh-Satoh M. et al. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44(11): 2192–201.
20. Van Driest S.L., Vasile V.C., Ommen S.R. et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44(9): 1903–10.
21. Ingles J., Doolan A., Chiu C. et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J. Med. Genet.* 2005; 42(10): e59.
22. Girolami F., Olivetto I., Passerini I. et al. A molecular screening strategy based on beta-myosin heavy chain, cardiac myosin binding protein C and troponin T genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Med. (Hagerstown)* 2006; 7(8): 601–7.
23. Millat G., Chanavat V., Crehalet H. et al. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta* 2010; 411(23–24): 1983–91.
24. Jordan D.M., Kiezun A., Baxter S.M. et al. Development and validation of a computational method for assessment of missense variants in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 2011; 88(2): 183–92.
25. Santos S., Marques V., Pires M. et al. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort. *BMC Med. Genet.* 2012; 13: 17.
26. Gomez J., Reguero J.R., Moris C. et al. Mutation analysis of the main hypertrophic cardiomyopathy genes using multiplex amplification and semi-conductor next-generation sequencing. *Circ. J.* 2014; 78(12): 2963–71.
27. Kapplinger J.D., Landstrom A.P., Bos J.M. et al. Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations from background genetic noise. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2014; 7(3): 347–61.
28. Millat G., Chanavat V., Rousson R. Evaluation of a new NGS method based on a custom AmpliSeq library and Ion Torrent PGM sequencing for the fast detection of genetic variations in cardiomyopathies. *Clin. Chim. Acta* 2014; 433: 266–71.
29. Cecconi M., Parodi M.I., Formisano F. et al. Targeted next-generation sequencing helps to decipher the genetic and phenotypic heterogeneity of hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Mol. Med.* 2016; 38(4): 1111–24.
30. Erdmann J., Raible J., Maki-Abadi J. et al. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; 38(2): 322–30.
31. Zeller R., Ivandic B.T., Ehlermann P. et al. Large-scale mutation screening in patients with dilated or hypertrophic cardiomyopathy: a pilot study using DGE. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2006; 84(8): 682–91.
32. Ehlermann P., Weichenhan D., Zehelein J. et al. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. *BMC Med. Genet.* 2008; 9: 95.
33. Fokstuen S., Lyle R., Munoz A. et al. A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum. Mutat.* 2008; 29(6): 879–85.
34. Toth T., Nagy V., Faludi R. et al. The Gln1233ter mutation of the myosin binding protein C gene: causative mutation or innocent polymorphism in patients with hypertrophic cardiomyopathy? *Int. J. Cardiol.* 2011; 153(2): 216–9.
35. Stenson P.D., Mort M., Ball E.V. et al. The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Hum. Genet.* 2014; 133(1): 1–9.
36. Waldmuller S., Erdmann J., Binner P. et al. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure. *Eur. J. Heart Fail.* 2011; 13(11): 1185–92.
37. Meyer T., Ruppert V., Ackermann S. et al. Novel mutations in the sarcomere protein myopalladin in patients with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013; 21(3): 294–300.
38. Misalski-Jamka K., Jefferies J.L., Mazur W. et al. Novel genetic triggers and genotype-phenotype correlations in patients with left ventricular noncompaction. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017; 10(4): pii: e001763.
39. Seidemann S.B., Smith E., Subrahmanyam L. et al. Application of whole exome sequencing in the clinical diagnosis and management of inherited cardiovascular diseases in adults. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017; 10(1): pii: e001573.
40. Bagnall R.D., Yeates L., Semsarian C. Analysis of the Z-disc genes PDLIM3 and MYPN in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 2010; 145(3): 601–2.
41. Purejav E., Arimura T., Augustin S. et al. Molecular basis for clinical heterogeneity in inherited cardiomyopathies due to myopalladin mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21(9): 2039–53.
42. Duboscq-Bidot L., Xu P., Charron P. et al. Mutations in the Z-band protein myopalladin gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc. Res.* 2008; 77(1): 118–25.
43. Berge K.E., Lerer T.P. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Norway. *Clin. Genet.* 2014; 86(4): 355–60.
44. Savarese M., Di Fruscio G., Mutarelli M. et al. MotorPlex provides accurate variant detection across large muscle genes both in single myopathic patients and in pools of DNA samples. *Acta Neuropathol. Commun.* 2014; 2: 100.
45. Bos J.M., Ackerman M.J. Z-disc genes in hypertrophic cardiomyopathy: stretching the cardiomyopathies? *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010; 55(11): 1136–8.
46. Maron B.J., Maron M.S., Maron B.A. et al. Moving beyond the sarcomere to explain heterogeneity in hypertrophic cardiomyopathy: JACC review topic of the week. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019; 73(15): 1978–86.
47. Bagnall R.D., Ingles J., Dinger M.E. et al. Whole genome sequencing improves outcomes of genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018; 72(4): 419–29.
48. Ingles J., Burns C., Bagnall R.D. et al. Nonfamilial hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, natural history, and clinical implications. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2017; 10(2): pii: e001620.
49. Ma N., Zhang J.Z., Itzhaki I. et al. Determining the pathogenicity of a genomic variant of uncertain significance using CRISPR/Cas9 and human-induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2018; 138(23): 2666–81.
50. Lan F., Lee A.S., Liang P. et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; 12(1): 101–13.
51. Han L., Li Y., Tchao J. et al. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc. Res.* 2014; 104(2): 258–69.