

DOI: 10.15690/vramn872

К.В. Савостьянов, Л.С. Намазова-Баранова, Е.Н. Басаргина, Н.Д. Вашакмадзе, Н.В. Журкова, А.А. Пушков, И.С. Жанин, Н.А. Сдвигова, В.Ю. Луканина, А.Г. Никитин

Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей, Москва, Российская Федерация

Новые варианты генома российских детей с генетически обусловленными кардиомиопатиями, выявленные методом массового параллельного секвенирования

242

Обоснование. Кардиомиопатии у детей относятся к тяжелым, непрерывно прогрессирующим заболеваниям миокарда, характеризующимся разнообразием причин, симптомов и проявлений, высокой летальностью. В мировой литературе описано более 400 генов, мутации которых приводят к развитию генетически обусловленных болезней сердца и сосудов. Применение высокопроизводительного метода массового параллельного секвенирования позволяет проводить исследование протяженных целевых областей генома для обнаружения вариантов и их дальнейшего биоинформатического анализа на предмет патогенности. **Цель исследования** — выявление генетической этиологии развития наследственных кардиомиопатий среди детского населения России. **Методы.** В исследование были включены 103 пациента с различными фенотипами кардиомиопатий в возрасте от 3 мес до 17 лет 9 мес на момент обследования, наблюдавшиеся в кардиологическом отделении и отделении восстановительного лечения детей с болезнями сердечно-сосудистой системы ФГАУ «НМИЦ здоровья детей». Всем пациентам методом массового параллельного секвенирования проведен анализ целевых областей 404 генов, мутации в которых приводят к развитию наследственных болезней сердца и сосудов. **Результаты.** Разработан диагностический алгоритм на основе метода массового параллельного секвенирования. Идентифицировано 176 258 минорных вариантов у 103 пациентов в исследуемых целевых регионах генома. В среднем у каждого пациента выявлено 1711 нуклеотидных замен, отличающихся от референсной последовательности. Установлено, что около 40% обнаруженных нами вариантов приходится на гены *MYH7*, *MYBPC3*, *TTN*, *MYH6*, *SCN5A*, *DSC2* и *TPM1*. Биоинформатический анализ позволил выявить 68 новых вариантов генома, ассоциированных с развитием кардиомиопатий. Обнаружена достоверная ассоциация носительства патогенных вариантов гена *MYBPC3* с развитием гипертрофической кардиомиопатии у российских детей — $OR\ 3,17\ (1,36-11,72; p=0,009)$. **Заключение.** Применение предложенного алгоритма позволило установить лабораторные диагнозы 99 (96,1%) пациентам из 103 обследованных, в том числе с синдромальными и несиндромальными формами наследственных болезней сердца и сосудов, проявляющимися фенотипом кардиомиопатии.

Ключевые слова: кардиомиопатии, генетика человека, высокопроизводительное секвенирование, патогенность, поиск мутаций.

(Для цитирования: Савостьянов К.В., Намазова-Баранова Л.С., Басаргина Е.Н., Вашакмадзе Н.Д., Журкова Н.В., Пушков А.А., Жанин И.С., Сдвигова Н.А., Луканина В.Ю., Никитин А.Г. Новые варианты генома российских детей с генетически обусловленными кардиомиопатиями, выявленные методом массового параллельного секвенирования. *Вестник РАМН*. 2017;72 (4):242–253. doi: 10.15690/vramn872)

Обоснование

Кардиомиопатии (КМП) — группа болезней миокарда, характеризующаяся структурными и функциональными изменениями сердечной мышечной ткани. Согласно современной классификации, выделяют первичные, развивающиеся вследствие повреждения миокарда, и вторичные, развивающиеся вследствие генерализованных системных заболеваний и сопровождающиеся повреждением миокарда кардиомиопатии. Эти категории разбиваются на группы в зависимости от этиологии заболевания [1].

К первичным относятся генетические, приобретенные и смешанные кардиомиопатии. *Генетические КМП* обусловлены мутациями генов, кодирующих различные белки, участвующие в формировании и функционировании миокарда. Генетические КМП подразделяют на гипертрофическую кардиомиопатию (ГКМП); аритмогенную кардиомиопатию, или дисплазию правого желудочка (АКМП); некомпактный миокард левого желудочка (НМЛЖ); PRKAG2- и LAMP2-зависимые болезни

накопления гликогена и ионные каналопатии¹. *Приобретенные (ненаследственные) КМП*, причинами развития которых являются негенетические факторы, подразделяют на воспалительную (миокардиты), стрессовую (такоцубо) КМП; КМП беременных; КМП, обусловленную тахикардией, а также КМП детей, рожденных от матерей с сахарным диабетом I типа [3]. Среди *смешанных форм* выделяют дилатационную (ДКМП) и рестриктивную (РКМП) кардиомиопатии, которые могут быть обусловлены как генетическими дефектами, так и развиваться вследствие влияния различных (средовых) факторов.

Ко вторичным КМП относятся инфильтративные (амилоидоз, болезнь Гоше, мукополисахаридоз), токсические (лекарственная, химическая, радиационная), эндокринные (сахарный диабет, гипертириозидизм, гипотирозидизм, гиперпаратирозидизм, феохромоцитома,

¹ Позднее ионные каналопатии было предложено вывести из номенклатуры КМП в связи с тем, что мутации генов, отвечающих за ионные каналопатии, не всегда приводят к морфофункциональному фенотипу КМП [2].

акромегалия), воспалительные (саркоидоз), эндомикардиальные (эндомикардиальный фиброз) кардиомиопатии, а также кардиомиопатии при болезнях накопления (гемохроматоз, болезнь Фабри, болезнь Паркинсона, болезнь Ниманна–Пика), нервно-мышечных болезнях, аутоиммунных заболеваниях и болезнях соединительной ткани, синдромах Нунан и Леопард, дефиците питательных веществ и др. [3].

Характерным осложнением кардиомиопатий является сердечная недостаточность: на это заболевание (в частности, ГКМП и АКМП) приходится значительная доля внезапных сердечных смертей спортсменов и молодых людей в возрасте до 35 лет, что диктует необходимость проведения скрининга на предмет выявления патологического состояния [4]. Отметим, что гипертрофическая кардиомиопатия занимает ведущее место в структуре генетически обусловленных заболеваний сердечно-сосудистой системы. По средним оценкам, частота встречаемости ГКМП составляет 1 случай на 500 человек [5].

За последние десятилетия достигнуты значительные успехи в изучении генетических механизмов, обуславливающих патогенез повреждения миокарда, что способствовало открытию множества генов, ассоциированных с наследственными формами КМП, пересмотру существовавшей номенклатуры и появлению новой системы классификации КМП. Загадочная болезнь миокарда перестала считаться идиопатической, ее все чаще стали называть болезнью саркомера [6], наследуемой в большинстве случаев в соответствии с аутосомно-доминантным механизмом и обладающей варьирующей экспрессивностью и неполной пенетрантностью [7]. Однако существенное увеличение количества генов-кандидатов, значительная аллельная гетерогенность, характерная для всех типов КМП, требовали последовательного анали-

за всех кодирующих областей этих генов, который при использовании традиционных технологий двунаправленного секвенирования представлял собой достаточно длительный и дорогостоящий процесс. При этом ни результаты функциональной диагностики, ни установленные ранее ассоциации между генотипом и фенотипом не позволяли ощутимо сократить количество исследуемых генов ввиду существенного генетического и фенотипического перекрытия между различными типами КМП, что приводило к дополнительным сложностям как на этапе генетического тестирования, так и при интерпретации полученных результатов [8].

Технология секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), активно используемая с 2012 г. в молекулярно-генетических исследованиях, имеющих клиническую направленность, позволила устранить указанные недостатки и обеспечила возможность одновременного анализа протяженных целевых областей генома человека. Однако высокопроизводительное исследование огромных участков генома привело к увеличению вероятности обнаружения вариантов неясной клинической значимости, требующих проведения тщательного биоинформатического анализа [9].

Согласно практическим рекомендациям и заключениям экспертных кардиологических сообществ, ведение пациентов с наследственными КМП включает генетическое тестирование, изучение семейной (не менее трех поколений) истории, а также клинический и генетический скрининг членов семьи пробанда, в т.ч. медико-генетическое консультирование [10]. Генетическое тестирование группы риска в отягощенных семьях способствует исключению болезни у одних родственников и выявлению патогенных генетических вариантов у других, что снижает

K.V. Savostyanov, L.S. Namazova-Baranova, E.N. Basargina, N.D. Vashakmadze, N.V. Zhurkova, A.A. Pushkov, I.S. Zhanin, N.A. Sdvigova, V.Yu. Lukanina, A.G. Nikitin

National Medical Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

The New Genome Variants in Russian Children with Genetically Determined Cardiomyopathies Revealed with Massive Parallel Sequencing

Background: Cardiomyopathies in children are serious, continuously progressing myocardium diseases which are characterized by a variety of the causes, symptoms, implications, and high lethality. More than 400 genes that can cause hereditary heart and vessels diseases are described in scientific literature. The application of a high-performance method of massive parallel sequencing allows to conduct the investigation of genome extended targeted areas revealing the variants and analyzing them (bioinformatics) for pathogenicity. **Aims:** Identification of a genetic etiology of hereditary cardiomyopathies development in children's population of the Russian Federation. **Materials and methods:** The research included 103 patients with various phenotypes of cardiomyopathies aged from 3 months up to 17 years 9 months who at the moment of examination were observed in the cardiology department and the department of recovery treatment with cardiovascular diseases in the NMRCCH. All patients were performed massive parallel sequencing analyzing the targeted areas of 404 genes which mutations lead to the development of heart and vessels hereditary diseases. **Results:** The diagnostic algorithm based on the method of a massive parallel sequencing was developed. 176 258 minor options were identified in the explored target areas of genome of 103 patients. An average number of the revealed nucleotide replacements different from the reference sequence was 1711. We observed that about 40% of all variants founded by our means were found in MYH7, MYBPC3, TTN, MYH6, SCN5A, DSC2 and TPM1 genes. Bioinformatics analysis allowed revealing 68 novel genome variants associated with cardiomyopathy development. The reliable association of carriage of pathogenic option in MYBPC3 gene with development of hypertrophic cardiomyopathy in the Russian children was found. **Conclusions:** The application of the offered algorithm allowed establishing laboratory diagnoses to 99 (96.1%) patients out from 103 investigated subjects including the syndromal and non-syndromal forms of heart and vessels hereditary diseases which showed a cardiomyopathy phenotype.

Key words: cardiomyopathies, human genetics, high-throughput sequencing, pathogenicity, search for mutations.

(For citation) Savostyanov KV, Namazova-Baranova LS, Basargina EN, Vashakmadze ND, Zhurkova NV, Pushkov AA, Zhanin IS, Sdvigova NA, Lukanina VYu, Nikitin AG. The New Genome Variants in Russian Children with Genetically Determined Cardiomyopathies Revealed with Massive Parallel Sequencing. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*. 2017;72 (4):242–253. doi: 10.15690/vramn872)

риск заболеваемости и смертности посредством регулярного клинического мониторинга, назначения соответствующей терапии, а также сведению к минимуму вторичных случаев возникновения болезни в отягощенных семьях посредством пренатальной и преимплантационной диагностики.

Ввиду существенного генетического разнообразия наследственных КМП спектр патогенных вариантов, выявляемых в большинстве популяций, охарактеризован недостаточно полно, даже в генах с очевидной клинической значимостью. В статье представлена стратегия использования массового параллельного секвенирования для анализа панели генов-кандидатов, ответственных за развитие этой группы болезней. Описано применение метода массового параллельного секвенирования для изучения таргетных областей генома, доказавших связь с развитием генетически обусловленных форм болезней сердца и сосудов, известных к настоящему времени.

Цель исследования — выявление генетической этиологии развития наследственных КМП среди детского населения России, а также описание полученных фенотипических корреляций на основе биоинформатического анализа и изучения частоты и спектра различных патогенных вариантов исследованных генов с использованием технологии массового параллельного секвенирования.

Методы

Дизайн исследования

Сравнительное клиническое наблюдение. Исследование носило одномоментный моноцентровой характер.

Критерии соответствия

Критерии включения

Лица в возрасте до 18 лет, у которых на основании физикального осмотра, а также данных лабораторных и инструментальных методов исследований диагностирована кардиомиопатия.

Критерии исключения

Лица старше 18 лет; лица, имеющие клинические признаки синдромальных заболеваний (в т.ч. множественные стигмы дизэмбриогенеза), сопутствующую сердечно-сосудистую патологию (врожденные пороки сердца, артериальную гипертензию).

Диагностическим критерием дилатационного фенотипа кардиомиопатии являлась систолическая дисфункция, проявляемая снижением фракции выброса левого желудочка (ЛЖ) $<0,45$ (Z -score $>2SD$) и/или фракции укорочения $<25\%$ (Z -score $>2SD$), при исключении врожденных пороков сердца, приводящих к развитию вторичной КМП (клапанные пороки сердца, заболевания коронарных артерий), артериальной гипертензии и воспалительных заболеваний миокарда. Конечно-диастолический размер ЛЖ $>117\%$ прогнозируемого значения с поправкой на возраст и площадь поверхности тела [11].

Диагностическим критерием гипертрофического фенотипа кардиомиопатии у детей являлось утолщение стенки ЛЖ при эхокардиографии более чем на 2 стандартных отклонения от предполагаемого среднего значения (Z -score $>2SD$); кроме того, у детей старшего возраста в качестве дополнительного критерия было добавлено увеличение толщины стенки ЛЖ >15 мм в одном или

нескольких сегментах миокарда ЛЖ, которое не может быть объяснено нагрузкой давлением, в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов (European Society of Cardiology, ESC) 2014 г. [12].

Диагностическими критериями НМЛЖ являлись соотношение некомпактного слоя миокарда к компактному слою более 2 (двухслойная структура миокарда выявляется из парастернальной позиции по короткой оси); отсутствие других сопутствующих аномалий сердца; наличие многочисленных, чрезмерно выступающих в полость левого желудочка трабекул с глубокими межтрабекулярными пространствами; сообщающиеся с полостью левого желудочка межтрабекулярные пространства, выявляемые с помощью цветного доплеровского картирования [13]. Для отбора пациентов с НМЛЖ по данным магнитно-резонансной томографии использовались схожие диагностические критерии: наличие двух слоев миокарда — компактного и некомпактного, истончение компактного слоя миокарда, соотношение некомпактного слоя и компактного более 2 [14].

Для отбора пациентов с РКМП использовались следующие эхокардиографические критерии: выраженная дилатация предсердий на фоне уменьшения полости пораженного желудочка, рестриктивный тип диастолической дисфункции (укорочение времени изоволюмического расслабления, увеличение пика раннего наполнения, уменьшение пика позднего предсердного наполнения желудочков, увеличение отношения раннего наполнения к позднему) при ненарушенной систолической функции, функциональная митральная и/или трикуспидальная регургитация, признаки легочной гипертензии [15].

Семейные формы исследовались при наличии в семье двух или более родственников с установленным клиническим диагнозом либо при наличии достоверной информации хотя бы об одном случае внезапной сердечной смерти в возрасте ранее 35 лет [11].

Условия проведения

Все дети были отобраны среди пациентов, наблюдавшихся в кардиологическом отделении и отделении восстановительного лечения детей с болезнями сердечно-сосудистой системы Национального медицинского исследовательского центра здоровья детей Минздрава России, и направлены на диагностику в лабораторию молекулярной генетики и клеточной биологии Центра.

Продолжительность исследования

Исследование проводилось с марта 2016 по апрель 2017 г.

Описание медицинского вмешательства

Всем пациентам был осуществлен забор 1–2 мл цельной венозной крови в пробирку-вакутейнер с антикоагулянтом ЭДТА².

Исходы исследования

Основной исход исследования

Конечные точки в нашем исследовании — это регистрация генотипов в таргетных областях генома, нуклеотидные замены в которых приводят к развитию генетически обусловленных болезней сердца и сосудов.

² ЭДТА (от англ. ethylenediaminetetraacetic acid) — этилендиаминтетрауксусная кислота.

Анализ в подгруппах

Группы сформированы на основании данных семейного анамнеза, результатов физикального осмотра, инструментальных методов обследования (эхокардиография, магнитно-резонансная томография, электрокардиография, холтеровское мониторирование ЭКГ). Все пациенты были разделены на четыре группы по фенотипу заболевания: ДКМП, ГКМП, НМЛЖ, РКМП.

Методы регистрации исходов

Всем пациентам осуществлялось выделение геномной ДНК с помощью набора реактивов DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAQUBE (QIAGEN, Германия). Качество и количество выделенной геномной ДНК исследовалось при помощи флуориметра нового поколения Qubit 3.0 (Invitrogen, США). Геномная ДНК, соответствующая всем необходимым требованиям, была отправлена на молекулярно-генетическую диагностику методом массового параллельного секвенирования, подразумевающим мультиплексное исследование целевых областей 404 генов, мутации в которых приводят к развитию максимального количества известных к настоящему времени наследственных болезней сердца и сосудов. Под целевыми областями подразумевались все промоторные, кодирующие и прилегающие интронные области этих генов. Таргетные области, включающие 2 145 839 пар нуклеотидов (п.н.), были обогащены со средним покрытием 291X. Длина среднего прочтения одного фрагмента составила 181 п.н. Пробоподготовка и массовое параллельное секвенирование осуществлялось на оборудовании Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколами и рекомендациями производителя. Все найденные минорные варианты исследованных генов с частотой встречаемости менее 0,5% по информационным базам dbSNP (Short Genetic Variations database) и ExAC (Exome Aggregation Consortium³), в том числе новые нуклеотидные замены, не описанные ранее, были подвергнуты биоинформатическому анализу с использованием программ Alamut Batch и Alamut Focus (Interactive Biosoftware, Франция) на предмет возможной патогенности и валидированы при помощи метода двустороннего секвенирования по Сэнгеру. Не описанные ранее мутации, патогенность которых была подтверждена путем биоинформатического анализа, были подвергнуты семейному анализу. Для проведения секвенирования по Сэнгеру вся исходная геномная ДНК подвергалась амплификации при помощи олигонуклеотидов, подобранных в программе Beacon Designer 8.10. Проверка специфичности пар праймеров проводилась с помощью программы Primer-BLAST (National Center for Biotechnological Information, NCBI, США). Продукты амплификации секвенировались при помощи набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколами и рекомендациями производителя на оборудовании ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Этическая экспертиза

Результаты получены в ходе выполнения научно-исследовательской работы «Новые высокотехнологичные методы диагностики и лечения болезней сердца и сосудов у детей». Тема утверждена на совместном заседании Ученого совета и ЛНЭК ФГАУ ФБГУ «НЦЗД» (в настоящее

время ФГАУ «НМИЦ здоровья детей») Минздрава России, протокол № 9 от 22.11.2010 г.

Родители или законные представители пациентов, включенных в исследование, подписывали информированное согласие на проведение данного генетического исследования, а также на обработку персональных данных и внесение их в регистр.

Статистический анализ

Пациенты были охарактеризованы по полу, возрасту, семейному анамнезу и наличию патогенных вариантов.

Для статистического анализа категориальных данных использовался пакет R, версия 3.3.0 (R Foundation, США). Анализ проводился с помощью метода логистической регрессии. Ассоциации оценивались на основе логистической модели распределения с учетом доминантной модели наследования. Достоверным считался уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты

Объекты (участники) исследования

В исследовании были включены 103 ребенка: 59 (57,3%) мальчиков и 44 (42,7%) девочки в возрасте от 3 мес до 17 лет 9 мес на момент обследования. Пациенты с фенотипом ДКМП составили 47 (45,6%) человек, с ГКМП — 33 (32,0%), с признаками НМЛЖ — 28 (27,2%), с нарушениями ритма сердца — 18 (17,5%), с РКМП — 4 (3,9%). У 27 (26,2%) детей перекрывались различные фенотипы. У 43 (41,7%) пациентов КМП носила семейный характер, у 60 (58,3%) — спорадический.

Основные результаты исследования

В общей сложности мы идентифицировали 176 258 минорных вариантов у 103 пациентов в исследуемых целевых регионах генома. У каждого пациента в среднем было выявлено 1711 нуклеотидных замен, отличающихся от референсной последовательности.

Для получения информации о значимости каждого найденного варианта мы выполнили поэтапный подход к фильтрации этих вариантов, исключив все известные варианты с частотой встречаемости в европейской популяции более 0,5%, согласно базе данных ExAC. Это позволило значительно сократить общее количество анализируемых нуклеотидных замен до 807 вариантов, расположенных в 251 гене. Однако следует отметить, что отсекание редких вариантов генома с частотой встречаемости более 0,5% не исключает возможности появления патогенных вариантов, связанных с эффектом основателя в популяциях с плохо изученной генетической архитектурой той или иной наследственной болезни (в частности, КМП).

По результатам проведенного исследования, наибольшее количество вариантов с частотой встречаемости менее 0,5% было обнаружено в гене *TTN*, что связано с тем, что ген кодирует самый крупный белок человека [16], а его кодирующие области составляют около 10% длины всей изученной нами таргетной последовательности нуклеотидов. При сопоставлении количества найденных вариантов с размером каждого гена было обнаружено довольно равномерное распределение, исключаящее существование частых мутаций в изученных генах.

Следующий этап анализа полученных нами данных включал аннотацию 807 редких минорных аллелей с использованием международных баз данных HGMD

³ Exome Aggregation Consortium (ExAC) — международный консорциум специалистов, исследующих данные секвенирования экзома.

(Human Gene Mutation Database) и ClinVar (Clinical Variation database), что позволило обнаружить 93 описанных ранее мутации у 71 (68,9%) пациента.

На рис. 1 представлены наиболее частые синдромальные и несиндромальные формы КМП и нарушения ритма сердца, соответствующие обнаруженным патогенным вариантам, описанным ранее в базах данных HGMD и ClinVar. Наибольшее число описанных ранее мутаций приходится на ГКМП (у 25; 26,9%), ДКМП (у 17; 18,3%) и нарушения ритма сердца (у 15; 16,1%). Кроме того, выявлено 16 (17,2%) мутаций (на рис. 1 обозначены розовым цветом — «другие»), ассоциированных с фенотипом вторичных КМП, проявляющимся лишь в случае поражения обеих хромосом. Лишь у 6 пациентов из обследованной когорты детей были выявлены такие мутации в гетерозиготном состоянии и не выявлены при этом мутации, описанные для различных КМП с доминантным типом наследования.

Для вычисления вероятно патогенных вариантов мы выбрали все выявленные несинонимичные нуклеотидные замены, исключив описанные ранее как непатогенные, и при помощи биоинформатического программного обеспечения (SIFT, PolyPhen, MutationTast, MetaLR⁴) определили патогенность каждой из оставшихся на основании ее патогенности хотя бы в трех биоинформатических модулях из четырех использованных. В результате проведенного анализа 77 нуклеотидных замен, 75 из которых — миссенс-варианты (табл. 1), одна гемизиготная делеция *c.889_891del, p.K297del* в гене *LAMP2* и одна гетерозиготная делеция *c.741_776del, p.E248_S259del* в гене *RAF1*, не приводящие к сдвигу рамки считывания, были отобраны нами у 59 (57,3%) пациентов и классифицированы как вероятно патогенные. Чтобы выяснить, действительно ли эти варианты могут являться мутациями, мы дополнительно вычислили процент синглтонов, т.е. уникальных вариантов, не описанных ранее ни в одной из инфор-

мационных баз. Этот показатель составил 48/77 (62,3%) вариантов, что подчеркнуло строгость выбранного классификационного подхода.

Среди оставшихся вариантов, не аннотированных ранее в международных базах данных по мутациям и отличающихся от референсной последовательности изученных генов, в первую очередь был выполнен поиск высоковероятно патогенных вариантов. Суммарное количество таких вариантов, сдвигающих рамки считывания, приводящих к преждевременной терминации трансляции и изменяющих сайты сплайсинга, составило 29 (у 28 обследованных пациентов; 27,2%). В частности, были выявлены 6 различных неописанных делеций и 2 вставки, сдвигающие рамки считывания. Нам также удалось обнаружить 9 различных вариантов сайтов сплайсинга и 12 различных нонсенс-вариантов (табл. 2).

Наибольшее суммарное количество высоковероятно патогенных и вероятно патогенных вариантов было обнаружено в гене *MYH7*, что, по всей видимости, связано с тем, что именно в этом гене встречается наибольшее количество описанных мутаций, являющихся причинами генетически обусловленных КМП, приведенных в базе данных HGMD. Существенный процент неописанных ранее вариантов может указывать на высокую полиморфность генетических основ развития наследственных КМП и на их слабую изученность среди популяций, населяющих территорию современной России.

Просуммировав патогенные, высоковероятно патогенные и вероятно патогенные варианты, мы получили 199 нуклеотидных замен, выявленных в описываемой когорте обследованных пациентов в ходе проведенного нами исследования и последующего анализа данных, и распределили их по генам (рис. 2).

Из представленных данных следует, что около 40% обнаруженных вариантов приходится на гены *MYH7*, *MYBP3*, *TTN*, *MYH6*, *SCN5A*, *DSC2* и *TPM1*, что в целом коррелирует с результатами крупномасштабных многоцентровых исследований генетически обусловленных КМП, проведенных за рубежом [17, 18].

⁴ SIFT, PolyPhen, MutationTast, MetaLR — программы для анализа клинической значимости выявленных геномных вариантов.

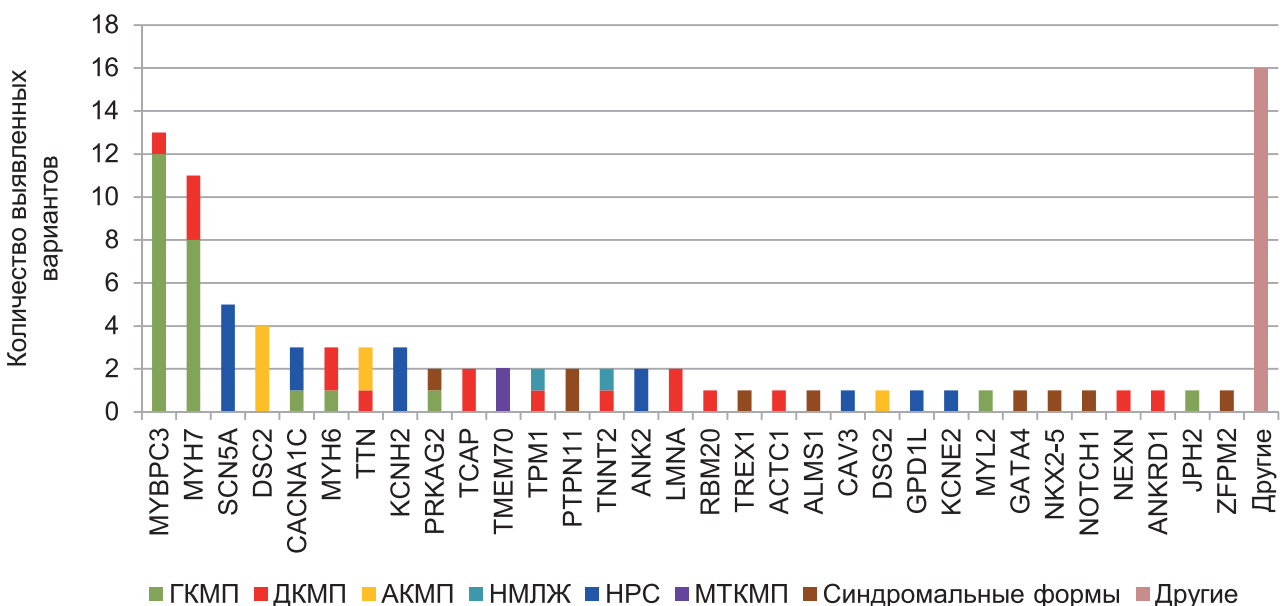


Рис. 1. Распределение выявленных патогенных вариантов исследованных генов, аннотированных в международных базах данных HGMD и ClinVar

Примечание. ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, ДКМП — дилатационная кардиомиопатия, АКМП — аритмогенная кардиомиопатия, НМЛЖ — некомпактный миокард левого желудочка, НРС — нарушения ритма сердца, МТКМП — митохондриальная кардиомиопатия.

Таблица 1. Биоинформатический анализ вероятно патогенных миссенс-вариантов, не аннотированных ранее в международных базах данных по мутациям

Варианты / частота встречаемости (количество пациентов)	SIFT	PolyPhen	MutationTast	MetaLR
<i>ACTC1</i> c.477T>A, p.D159E	-	D	D	D
<i>ACTC1</i> c.758G>T, p.G253V	D	D	D	D
<i>ACTC1</i> c.1039A>G, p.I347V	-	D	D	D
<i>ACTN2</i> c.440C>T, p.S147L / 0%	D	D	D	-
<i>ACTN2</i> c.2082G>C, p.K694N / 6,00E-05	D	D	D	-
<i>ACTN2</i> c.1331A>G, p.H444R	D	D	D	D
<i>AKAP9</i> c.11351G>A, p.R3784Q	D	D	D	-
<i>AKAP9</i> c.11495G>A, p.R3832H	D	D	D	-
<i>AKAP9</i> c.2581T>C, p.Y861H / 6,00E-04	D	D	D	-
<i>CAV1</i> c.358G>T, p.A120S	D	D	D	D
<i>CTNNA3</i> c.2573T>C, p.L858S / 3,00E-04	D	D	D	-
<i>CTNNA3</i> c.416C>A, p.A139E	D	D	D	-
<i>DMD</i> c.3326A>T, p.N1109I / 4,00E-04	D	D	D	-
<i>DSC2</i> c.2497C>T, p.R833C / 0%	D	D	D	D
<i>DSG2</i> c.1537G>A, p.V513M	D	D	D	D
<i>DSG2</i> c.436C>T, p.R146C / 1,50E-05	D	D	D	-
<i>DSP</i> c.1349C>T, p.P450L / 3,00E-05	D	D	D	-
<i>DTNA</i> c.445A>G, p.R149G	D	D	D	D
<i>EDN1</i> c.354G>C, p.K118N / 1,00E-04	D	D	D	D
<i>EMD</i> c.188A>G, p.D63G	-	D	D	D
<i>HCN4</i> c.2081A>T, p.E694V	D	D	D	D
<i>JPH2</i> c.611T>G, p.L204R	D	D	D	D
<i>KANSL1</i> c.2339A>G, p.D780G	D	D	D	-
<i>KCNA5</i> c.497A>C, p.D166A / 4,00E-04	D	D	D	D
<i>KCNJ5</i> c.605T>C, p.F202S	D	D	D	D
<i>LDB3</i> c.98C>T, p.T33I	D	D	D	-
<i>LDB3</i> c.1834G>A, p.A612T	D	D	D	D
<i>LMNA</i> c.1375A>T, p.N459Y	D	D	D	D
<i>MYBPC3</i> c.977G>A, p.R326Q / 7,80E-03	-	-	-	-
<i>MYBPC3</i> c.3197C>G, p.P1066R	D	D	D	D
<i>MYH6</i> c.4010C>T, p.S1337L / 1,52E-05	D	D	D	D
<i>MYH6</i> c.4424A>G, p.E1475G / 0%	D	D	D	D
<i>MYH6</i> c.2974G>A, p.A992T / 0%	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.545C>T, p.A182V	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.727C>A, p.R243S	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.1205C>T, p.P402L	D	D	D	-
<i>MYH7</i> c.2678C>A, p.A893E	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.1628C>T, p.A543V	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.2330G>A, p.R777K (2)	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.2372A>C, p.Q791P	-	D	D	D
<i>MYH7</i> c.2512C>T, p.P838S	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.2647G>A, p.E883K	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.2689A>C, p.N897H / 1,50E-05	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.2890G>C, p.V964K / 6,00E-04	D	D	D	D
<i>MYH7</i> c.3926C>T, p.T1309I	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.481G>A, p.A161T / 0%	D	-	D	D
<i>MYH7</i> c.4894G>A, p.A1632T / 1,50E-05	D	-	D	D
<i>MYL2</i> c.120G>C, p.R40S	D	D	D	-

Таблица 1. Биоинформатический анализ вероятно патогенных миссенс-вариантов, не аннотированных ранее в международных базах данных по мутациям (*Окончание*)

Варианты / частота встречаемости (количество пациентов)	SIFT	PolyPhen	MutationTast	MetaLR
<i>MYL2 c.206T>C, p.M69T</i> (2)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>MYLK c.3610C>T, p.R1204W</i> / 3,00E-04	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>MYPN c.1995G>T, p.Q665H</i> (2)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>MYPN c.2863C>T, p.R955W</i> / 7,00E-04 (2)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>MYPN c.802C>T, p.P268S</i> / 1,00E-04 (3)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>NEXN c.1255G>C, p.E419Q</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>PSEN2 c.1163C>T, p.T388M</i> / 6,02E-05 (3)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>RBM20 c.325G>A, p.A109T</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>RBM20 c.613C>A, p.Q205K</i> / 1,00E-04	<i>D</i>	<i>D</i>	-	<i>D</i>
<i>RBM20 c.1958C>T, p.T653I</i> / 5,00E-05	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>SCN5A c.3265C>T, p.P1089S</i>	-	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>SYNE2 c.17583G>T, p.W5861C</i> / 1,50E-05	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>SYNE2 c.2936A>T, p.H979L</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TCAP c.337C>T, p.L113F</i> / 2,00E-04	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TGFBR1 c.856T>C, p.Y286H</i> / 3,00E-05	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TMPO c.974T>A, p.I325K</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TNNC1 c.184G>A, p.D62N</i>	-	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TPM1 c.218T>A, p.L73Q</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TPM1 c.398G>A, p.R133Q</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TPM1 c.4G>A, p.D2N</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TTN c.42296A>G, p.D14099G</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TTN c.46591G>A, p.G15531R</i> / 3,00E-05	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TTN c.49964C>T, p.P16655L</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TTN c.53498A>G, p.Y17833C</i> (3)	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>TTN c.80263T>C, p.F26755L</i> / 2,00E-04	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	-
<i>TTN c.85846C>T, p.R28616W</i>	-	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>
<i>VCL c.2544C>A, p.D848E</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>

Примечание. *D* (от англ. Disease-causing) — нуклеотидная замена, вызывающая заболевание. Жирным шрифтом выделены уникальные нуклеотидные замены, не описанные ранее ни в одной из информационных баз данных; для остальных вариантов приведена частота их встречаемости среди европейских популяций (по данным ExAC). Для тех нуклеотидных замен, которые встретились более одного раза, в скобках приведено количество пациентов, являющихся их носителями.

Таблица 2. Высоковероятно патогенные варианты, не аннотированные ранее в международных базах данных по мутациям

Ген	Нуклеотидные и аминокислотные варианты		
	Приводящие к сдвигу рамки считывания	Оказывающие влияние на сплайсинг	Вызывающие преждевременную терминацию трансляции
<i>ALMS1</i>	-	-	<i>c.1063C>T, p.Q355X</i>
<i>ATP1A2</i>	<i>c.971del, p.G324Afs*3</i>	-	-
<i>DSG2</i>	-	-	<i>c.1088C>A, p.S363X</i> / 1,50E-03
<i>DSP</i>	<i>c.5004dup, p.L1669Tfs*15</i>	-	<i>c.4354A>T, p.R1452X</i>
<i>FHL1</i>	<i>c.4del, p.A2Rfs*28</i>	-	-
<i>HCN4</i>	-	-	<i>c.2083G>T, p.E695X</i>
<i>LAMP2</i>	<i>c.893_923del, p.E298Afs*38</i>	-	<i>c.733C>T, p.Q245X</i>
<i>MYBPC3</i>	-	<i>c.2738-5C>A</i>	<i>c.1855G>T, p.E619X</i>
<i>MYH7</i>	-	<i>c.4353+3G>T</i> / 7,00E-03	<i>c.3706G>T, p.E1236X</i>
<i>MYL3</i>	-	<i>c.559+1G>A</i>	-
<i>NEBL</i>	-	-	<i>c.1255G>T, p.E419X</i> / 5,15E-05
<i>NEXN</i>	-	<i>c.298+1G>C</i>	-
<i>PTPN11</i>	-	<i>c.1611+4C>A</i> / 1,50E-03	-
<i>PRKAG2</i>	-	<i>c.1585-1G>A</i>	-

Таблица 2. Высоковероятно патогенные варианты, не аннотированные ранее в международных базах данных по мутациям (Окончание)

Ген	Нуклеотидные и аминокислотные варианты		
	Приводящие к сдвигу рамки считывания	Оказывающие влияние на сплайсинг	Вызывающие преждевременную терминацию трансляции
<i>SNTA1</i>	-	-	<i>c.79C>T, p.Arg27X</i>
<i>SOS1</i>	<i>c.940_943del, p.Q314Yfs*13</i>	-	-
<i>TAZ</i>	<i>c.208del, p.E70Sfs*31</i>	-	-
<i>TBX20</i>	<i>c.831_832insTA, p.D278X</i>	-	-
<i>TPM1</i>	-	<i>c.375-3C>T / 1,00E-04</i>	-
<i>TTN</i>	-	<i>c.36790+1G>A</i>	<i>c.48499C>T, p.R16167X</i> <i>c.56572C>T, p.R18858X / 3,12E-05</i>
<i>VCL</i>	<i>c.1713del, p.A573Hfs*8</i>	<i>c.2746-4A>G</i>	<i>c.1708C>T, p.R570X / 0%</i>

Примечание. Жирным шрифтом выделены уникальные варианты, не описанные ранее ни в одной из информационных баз данных; для остальных минорных аллелей приведена частота их встречаемости среди европейских популяций (по данным ExAC).

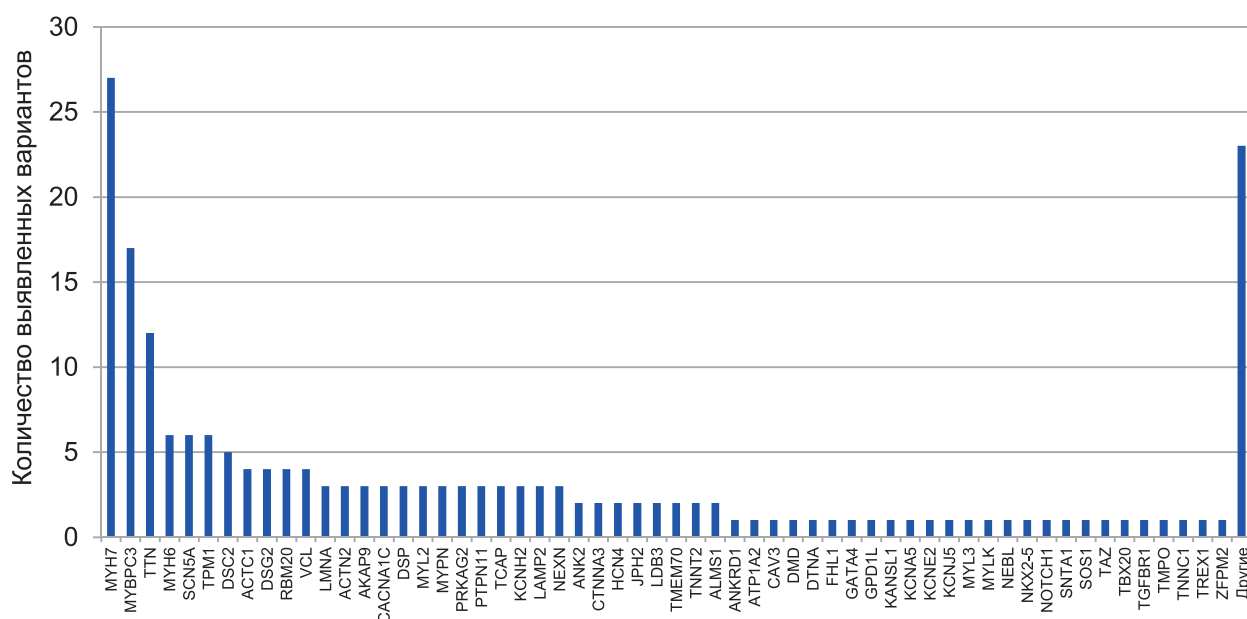


Рис. 2. Распределение 199 патогенных, высоковероятно патогенных и вероятно патогенных вариантов в исследованной когорте пациентов

Нежелательные явления

Нежелательных явлений не наблюдалось.

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

Из общего числа идентифицированных минорных вариантов в целевых областях генома у обследованных пациентов наибольшее число вариантов было обнаружено в гене *MYH7*. Данные по распределению относительных частот выявленных вариантов исследованных генов в целом соответствовали результатам многоцентровых исследований, проведенных за рубежом среди пациентов с генетически обусловленными кардиомиопатиями.

Обсуждение основного результата исследования

Разработанный метод массового параллельного секвенирования целевых областей 404 генов позволил поставить лабораторные диагнозы 99 (96,1%) пациентам из 103 обследованных, в том числе с синдромальными

и несиндромальными формами наследственных болезней сердца и сосудов, проявляющимися фенотипом КМП. У 2 пациентов с ГКМП были заподозрены синдромальные болезни, сопровождающиеся КМП, причиной развития которых могут являться протяженные делеции и/или вставки, которые не выявляются посредством проведения массового параллельного секвенирования. У двух других детей, один из которых с фенотипом РКМП, а другой — с фенотипом ДКМП, выявлены гетерозиготные минорные варианты генов с неизвестной патогенностью, обнаруженные так же во время проведения популяционных исследований, что не позволяет считать их причинными, несмотря на небольшую частоту встречаемости — <0,1% среди европейского населения.

Отметим, что ассоциации генотипа и фенотипа 57 обследованных нами детей совпадали с описанными ранее в международных базах, тогда как фенотип 8 пациентов не соответствовал описанному ранее фенотипу пациентов, обладающих такими же мутациями. Это может объясняться тем, что для рассматриваемых заболеваний описаны мутации, приводящие к различным фе-

нотипам, а также тем, что не все мутации, описанные в международных базах, являются истинно патогенными. Для проверки последнего предположения мы исключили варианты, выявленные ранее во время проведения общепопуляционных исследований, в результате чего не описанные при проведении общепопуляционных исследований патогенные варианты были обнаружены у 30 (31,3%) пациентов. При этом для 3 детей мы опровергли корреляции фенотипа и генотипа, обнаруженные ранее. Это сплайсинговые варианты *c.1928-2A>G* и *c.2905+1G>A* гена *MYBPC3* и миссенс-мутация *c.2146G>A*, *p.G716R* гена *MYH7*, описанные ранее лишь у пациентов с ГКМП [19–21] и обнаруженные нами у детей с дилатационным фенотипом. Интересно, что среди всех описанных ранее мутаций лишь нонсенс-мутация *c.3697C>T*, *p.Q1233X* гена *MYBPC3*, ассоциированная с семейной формой ГКМП [22], встретилась дважды у детей с семейной формой ГКМП из неродственных семей; остальные мутации, описанные ранее, были выявлены нами в единственном числе.

Для поиска ассоциаций генов, а также типа и количества найденных мутаций с различными фенотипическими проявлениями и тяжестью клинической картины мы вычислили число мутаций, приходящееся на каждого больного ребенка из когорты обследованных детей. Примечательно, что у 3 детей мы выявили 3 описанные мутации, у 1 ребенка — 4 описанные мутации, и еще у 1 — 5 описанных мутаций в разных генах (табл. 3).

Это распределение наглядно иллюстрирует корреляцию тяжести клинических проявлений в зависимости от числа выявленных генетических вариантов. Ввиду довольно высокой распространенности КМП семьи, имеющие более одной мутации, не являются редкими, и, как ожидается, их количество будет расти по мере совершенствования методов молекулярно-генетической диагностики.

При этом удалось отметить, что носительство единичных вариантов генов также способно вызывать тяжелейшую клиническую картину болезни. Так, варианты гена *MYH7 c.2512C>T*, *p.P838S* и *c.2513C>T*, *p.P838L*, расположенные в одном кодоне, явились причиной развития резистентных к проводимой терапии форм ДКМП и ГКМП соответственно и раннего летального исхода у обоих детей в возрасте до 2 лет. Первая мутация была описана ранее при тяжелых формах ГКМП и РКМП [23], тогда как вторая мутация не была описана ранее. Ее патогенность была подтверждена биоинформатическим путем и путем семейного анализа, доказавшего спонтанность ее возникновения. Кроме того, у 4 пациентов удалось обнаружить компаундное носительство 8 гетерозиготных мутаций в гене *MYBPC3: c.3197C>G*, *p.P1066R*

и *c.1928-2A>G*; *c.772G>A*, *p.E258K* и *c.3697C>T*, *p.Q1233X*; *c.1468G>A*, *p.G490R* и *c.3811C>T*, *p.R1271X*; *c.787G>A*, *p.G263R* и *c.2827C>T*, *p.R943X*, из которых 7 аннотированы в базе данных по мутациям HGMD. Все 4 случая КМП были семейными, поэтому обследование родителей помогло обнаружить причинные мутации, вызвавшие развитие болезни в соответствии с аутосомно-доминантным механизмом наследования. Остальные минорные аллели, по всей видимости, вносят вклад в фенотип больных детей, усугубляя его, однако ГКМП и ДКМП сами по себе не вызывают. В семьях, демонстрирующих аутосомно-доминантное наследование, сегрегация мутаций необходима для исключения маркировки носителей недетерминированных вариантов генов как возможных пациентов, так и для обеспечения правильной интерпретации результатов в случае пренатальной диагностики.

Среди всех обследованных пациентов у 4 детей были выявлены аутосомно-рецессивные формы болезни, подтвержденные при помощи семейного анализа. У девочки в возрасте 1 года 9 мес с фенотипом ДКМП, аффективно-респираторными пароксизмами, нистагмом и атрофией диска зрительного нерва были выявлены 2 мутации гена *ALMS1: c.1063C>T*, *p.Q355X*, не описанная ранее, и *c.4150dup*, *p.T1384Nfs*15*, описанная при синдроме Альстрема. У мальчика (4 года 6 мес) с фенотипом ГКМП, НМЛЖ, врожденным пороком сердца, нарушением ритма сердца и выраженной мышечной гипотонией были обнаружены 2 мутации гена *TMEM70: c.317-2A>G* и *c.578_579del*, *p.T193Sfs*6*, описанные ранее у пациентов с недостаточностью митохондриального комплекса V (АТФ-синтазной недостаточностью). У другого мальчика (3 года 7 мес) с фенотипом ДКМП и кардиофиброзом были обнаружены 2 не описанные ранее мутации гена *DSP*, приводящие к ДКМП с кератодермией: *c.4354A>T*, *p.R1452X* и *c.5004dup*, *p.L1669Tfs*15*. Особый интерес представляет также случай, описывающий мальчика (2 года 4 мес) с фенотипом ДКМП и гомозиготным сплайсинговым вариантом *c.559+1G>A* гена *MYL3*, для которого в базе данных OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) описано лишь аутосомно-доминантное наследование. Данный минорный аллель, вызвавший сплайс-изменение обеих хромосом, не был описан до проведения этого исследования ни в одной из информационных баз. Такой вариант был унаследован от клинически здоровых родителей, состоящих в близкородственном браке, и способствовал развитию тяжелой картины ДКМП у ребенка [24].

Кроме того, обнаруженные варианты генов, включая патогенные, высоковероятно патогенные и вероятно патогенные, выявленные в этом исследовании, были классифицированы в соответствии с функциональной

250

Таблица 3. Распределение обследованных пациентов в зависимости от числа выявленных вариантов

Число вариантов	Количество пациентов, чел. (%)	
	С описанными ранее патогенными вариантами	С высоковероятно патогенными и вероятно патогенными вариантами
0	32 (31,1)	16 (31,5)
1	44 (42,7)	64 (33,7)
2	22 (21,3)	17 (19,1)
3	3 (2,9)	5 (11,2)
4	1 (1)	1 (4,5)
5	1 (1)	0

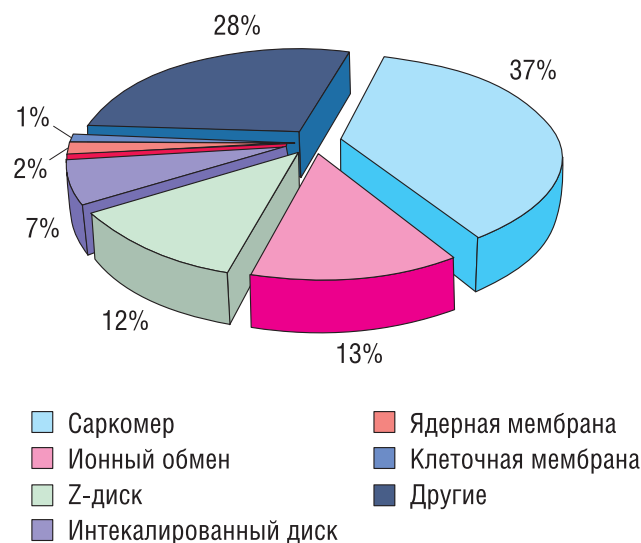


Рис. 3. Распределение выявленных патогенных, высоковероятно патогенных и вероятно патогенных вариантов по функциональному вкладу различных компонентов кардиомиоцитов

Примечание. Гены были сгруппированы на основании функционального вклада их продуктов в различные компоненты кардиомиоцитов по 7 группам (гены, кодирующие саркомерные белки; гены, кодирующие z-диск/цитоскелетные белки; гены, кодирующие белки, отвечающие за ионный обмен; гены, кодирующие интеркалированные диски; гены, продукты которых формируют ядерную оболочку, гены, продукты которых формируют клеточную мембрану; другие гены).

принадлежностью кодируемых ими продуктов различным компонентам кардиомиоцитов согласно информации, представленной на информационном ресурсе <http://www.genecards.org> (рис. 3). С учетом этой классификации в группе генов, кодирующих саркомерные белки, выявлено наибольшее число вариантов (37%); далее следуют группа генов, кодирующих белки, отвечающие за ионный обмен (13%); группа генов, кодирующих белки цитоскелета/z-диска (12%), и группа генов, кодирующих белки интеркалированного диска (7%). В группах генов, кодирующих ядерную оболочку и клеточную мембрану, было выявлено соответственно 2 и 1% вариантов исследованных генов.

Для поиска возможных ассоциаций между найденными вариантами и соответствующими клиническими проявлениями был проведен регрессионный анализ, выявивший значимые предикторы статуса ГКМП. Полученная достоверная ассоциация была обусловлена повышенным риском развития ГКМП у носителей вариантов гена *MYBPC3*, имеющих OR 3,17 (1,36–11,72; $p=0,009$).

Ограничения исследования

Целевые участки генома, изученные у пациентов, не могут дать полной информации о генетических причинах развития кардиомиопатий. Для поиска новых генов, мутации в которых могут приводить к развитию различных форм генетически обусловленных сердечно-сосудистых заболеваний, может быть рекомендовано полноэкзомное секвенирование. Ввиду незначительного размера выборки, используемой в данном исследовании, значимых межпопуляционных различий, а также генетической гетерогенности внутри одной популяции результаты исследования не могут быть экстраполированы на все человечество.

Выводы

В рамках этой работы впервые в России проведено масштабное исследование таргетных областей генома с целью выявления и описания этиологических причин развития генетически обусловленных КМП среди детского населения. Очевидно, что эти преимущественно аутосомно-доминантные болезни имеют немалую распространенность, значительную генетическую гетерогенность и медицинскую значимость, поэтому гены, вызывающие КМП, занимают важное место в списке генов Американской коллегии медицинской генетики и геномики и должны подвергаться обязательному анализу во всех случаях секвенирования экзома и генома [25]. Однако технология массового параллельного секвенирования сохраняет некоторые недостатки, такие как неполное покрытие и охват таргетных областей генома, риск ограниченной чувствительности и невозможность обнаружения клинически значимых вариантов генома длиной свыше 20 п.н. Для сведения к минимуму числа вероятных патогенных вариантов биоинформатический анализ должен включать в себя постадийную фильтрацию выявленных вариантов. При этом исключение из рассмотрения всех описанных в каких-либо информационных базах вариантов, особенно для таких нередких болезней, как генетически обусловленные КМП, может повлечь за собой потерю потенциально значимых вариантов, т.к. известно, что среди вариантов, описанных в базе dbSNP, отмечается незначительное число мутаций [26, 27]. С другой стороны, международные базы данных по мутациям содержат потенциально незначимые варианты, классифицированные ранее как мутации. Особенно это заметно для рассматриваемой группы болезней, т.к. технология молекулярно-генетической диагностики, применявшаяся в 90-е годы прошлого века, не позволяли анализировать объем рассматриваемой ныне информации ввиду огромной стоимости и трудоемкости ее получения, что иногда приводило к описанию вариантов, выявляемых в единственном исследованном гене, как патогенных.

Заключение

Разработанный диагностический алгоритм на основе метода массового параллельного секвенирования с валидацией выявленных вариантов методом Сэнгера позволил продемонстрировать высокую аналитическую точность диагностики в обследованной когорте пациентов (установлены лабораторные диагнозы у 96,1% обследованных пациентов, в том числе с синдромальными и несиндромальными формами генетически обусловленных КМП), обосновывая продолжающийся в развитых странах переход парадигмы от низко- к высокопроизводительной геномике в медицине.

Источник финансирования

Исследование проводилось в рамках реализации научно-исследовательской работы «Новые высокотехнологичные методы диагностики и лечения болезней сердца и сосудов у детей» в ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ЛИТЕРАТУРА

1. McCartan C, Mason R, Jayasinghe SR, Griffiths LR. Cardiomyopathy classification: ongoing debate in the genomics era. *Biochem Res Int*. 2012;2012:796926. doi: 10.1155/2012/796926.
2. Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, et al. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(3):304–318. doi: 10.1016/j.jacc.2014.05.027.
3. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. 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. *Circulation*. 2006;113(14):1807–1816. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287.
4. Barsheshet A, Brenyo A, Moss AJ, Goldenberg I. Genetics of sudden cardiac death. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13(5):364–376. doi: 10.1007/s11886-011-0209-y.
5. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, 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):785–789. doi: 10.1161/01.cir.92.4.785.
6. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation*. 2002;105(4):446–451. doi: 10.1161/hc0402.102990.
7. Landstrom AP, Ho CY, Ackerman MJ. Mutation type is not clinically useful in predicting prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. 2010;122(23):2441–2450. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.954446.
8. Rubiś P, Wiśniowska-Śmiałek S, Rudnicka-Sosin L, et al. Overlap cardiomyopathy — coexistence of hypertrophic and restrictive cardiomyopathy phenotypes in one patient (RCD code: III-2A.1). *JRCD*. 2014;1(6):21–28. doi: 10.20418/jrcd.vol1no6.119.
9. Lopes LR, Zekavati A, Syrris P, et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing. *J Med Genet*. 2013;50(4):228–239. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-101270.
10. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart Rhythm*. 2011;8(8):1308–1339. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.05.020.
11. Mestroni L, Rocco C, Gregori D, et al. Familial dilated cardiomyopathy: evidence for genetic and phenotypic heterogeneity. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(1):181–190. doi: 10.1016/S0735-1097(99)00172-2.
12. Рабочая группа по диагностике и лечению гипертрофической кардиомиопатии Европейского общества кардиологов (ESC). Рекомендации ESC по диагностике и лечению гипертрофической кардиомиопатии 2014 // *Российский кардиологический журнал*. — 2015. — №5 — С. 7–57. [The task force for the diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). 2014 ESC Guidelines on Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Rossiiskii kardiologicheskii zhurnal*. 2016;(5):7–57. (In Russ).] doi: 10.15829/1560-4071-2015-05-7-57.
13. Jenni R, Oechslin EN, van der Loo B. Isolated ventricular non-compaction of the myocardium in adults. *Heart*. 2007;93(1):11–15. doi: 10.1136/hrt.2005.082271.
14. Макаренко В.Н., Александрова С.А., Дарий О.Ю., и др. Оценка структурно-функционального состояния миокарда с помощью магнитно-резонансной томографии у пациентов с синдромом «некомпактный миокард» // *Диагностическая и интервенционная радиология*. — 2011. — Т.5. — №2 (Приложение). — С. 256. [Makarenko VN, Aleksandrova SA, Darii OYu, et al. Otsenka strukturno-funktsional'nogo sostoyaniya miokarda s pomoshch'yu magnitno-rezonansnoi tomografii u patsientov s sindromom «nekompaktnyi miokard». *Diagnosticheskaya i intervensionnaya radiologiya*. 2011;5(2 suppl.):256. (In Russ).]
15. Федеральные клинические рекомендации по оказанию медицинской помощи детям с кардиомиопатиями. — М.: Союз педиатров России, Ассоциация детских кардиологов в России; 2014. — 23 с. [Federal'nye klinicheskie rekomendatsii po okazaniyu meditsinskoi pomoshchi detyam s kardiomiopatiyami. Moscow: Soyuz pediatrov Rossii, Assotsiatsiya detskikh kardiologov v Rossii; 2014. 23 p. (In Russ).]
16. Opitz CA, Kulke M, Leake MC, et al. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12688–12693. doi: 10.1073/pnas.2133733100.
17. Cahill TJ, Ashrafian H, Watkins H. Genetic cardiomyopathies causing heart failure. *Circ Res*. 2013;113(6):660–675. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300282.
18. Walsh R, Thomson KL, Ware JS, et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med*. 2017;19(2):192–203. doi: 10.1038/gim.2016.90.
19. Jordan DM, Kiezun A, Baxter SM, et al. Development and validation of a computational method for assessment of missense variants in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*. 2011;88(2):183–192. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.01.011.
20. Teirlinck CH, Senni F, El Malti R, et al. A human MYBPC3 mutation appearing about 10 centuries ago results in a hypertrophic cardiomyopathy with delayed onset, moderate evolution but with a risk of sudden death. *BMC Med Genet*. 2012;13:105. doi: 10.1186/1471-2350-13-105.
21. Helms AS, Davis FM, Coleman D, et al. Sarcomere mutation-specific expression patterns in human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet*. 2014;7(4):434–495. doi: 10.1161/Circgenetics.113.000448.
22. Ehlermann P, Weichenhan D, Zehlein J, et al. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene. *BMC Med Genet*. 2008;9:95. doi: 10.1186/1471-2350-9-95.
23. Karam S, Raboisson MJ, Ducreux C, et al. A de novo mutation of the beta cardiac myosin heavy chain gene in an infantile restrictive cardiomyopathy. *Congenit Heart Dis*. 2008;3(2):138–143. doi: 10.1111/j.1747-0803.2008.00165.x.
24. Lukanina V, Vashakmadze N, Zhurkova N, et al. P123 Rare hereditary cardiomyopathy caused by novel homozygous mutation in the myl3 gene. *Arch Dis Child*. 2017;102(Suppl. 2):A81–A82. doi: 10.1136/archdischild-2017-313273.211.
25. Green RC, Berg JS, Grody WW, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565–574. doi: 10.1038/gim.2013.73.
26. Smigielski EM, Sirotkin K, Ward M, Sherry ST. dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*. 2000;28(1):352–355. doi: 10.1093/nar/28.1.352.
27. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011;12(11):745–755. doi: 10.1038/nrg3031.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Савостьянов Кирилл Викторович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-09-19, e-mail: 7443333@gmail.com, SPIN-код: 6377-3090, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-4885-4171>

Намазова-Баранова Лейла Сеймуровна, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель директора ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России по научной работе, директор НИИ педиатрии

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (495) 967-14-14, e-mail: namazova@nczd.ru, SPIN-код: 1312-2147, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2209-7531>

Басаргина Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кардиологическим отделением ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-01-93, e-mail: basargina@nczd.ru, SPIN-код: 5302-0767, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0144-2885>

Вашакмадзе Нато Джумберовна, кандидат медицинских наук, заведующая отделением восстановительного лечения детей с болезнями сердечно-сосудистой системы ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-08-15, e-mail: vashakmadze@nczd.ru, SPIN-код: 2906-9190, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8320-2027>

Журкова Наталья Вячеславовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-09-19, e-mail: zhurkovanv@nczd.ru, SPIN-код: 4768-6310, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6614-6115>

Пушков Александр Алексеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-09-19, e-mail: pushkovaa@nczd.ru, SPIN-код: 2928-5764, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-6648-2063>

Жанин Илья Сергеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-09-19, e-mail: ilya_zhanin@outlook.com, SPIN-код: 6108-2016, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1423-0379>

Сдвигова Наталья Андреевна, аспирант кардиологического отделения ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-01-93, e-mail: sdvigova-natalya@yandex.ru, SPIN-код: 1765-5309, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-5313-1237>

Луканина Валентина Юрьевна, врач-кардиолог отделения восстановительного лечения детей с болезнями сердечно-сосудистой системы ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-08-15, e-mail: lukanina@nczd.ru, SPIN-код: 3237-2986, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-2133-8284>

Никитин Алексей Георгиевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России

Адрес: 119991, Москва, Ломоносовский проспект, д. 2, стр. 1, тел.: +7 (499) 134-09-19, e-mail: avialn@gmail.com, SPIN-код: 3367-0680, ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-9762-3383>