

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«ТОМСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(Томский НИМЦ)

Научно-исследовательский институт медицинской генетики

На правах рукописи

Валиахметов Наиль Раушанович



**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ САРКОМЕРНЫХ БЕЛКОВ
ПРИ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА**

1.5.7 – генетика (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Назаренко Мария Сергеевна

Томск – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Гипертрофическая кардиомиопатия: определение, историческая справка, классификация.....	18
1.1.1 История изучения гипертрофической кардиомиопатии.....	19
1.1.2 Классификация гипертрофической кардиомиопатии.....	23
1.2 Гены «гипертрофической кардиомиопатии».....	28
1.2.1 Гены саркомерных белков и их продукты.....	31
1.2.2 Структура саркомера.....	32
1.2.3 Гены <i>MYBPC3</i> , <i>MYH7</i> , <i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> и <i>TPM1</i>	32
1.3 Современные молекулярно-генетические подходы к изучению генетической основы гипертрофической кардиомиопатии.....	40
1.4 Заключение.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. Дизайн исследования.....	47
2.2 Характеристика выборок пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии.....	49
2.3 Молекулярно-генетическое обследование.....	51
2.3.1. Выделение ДНК из крови.....	51
2.3.2 Массовое параллельное секвенирование.....	53
2.3.2.1 Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.....	54
2.3.2.2 Подбор праймеров и ПЦР-амплификация исследуемых длинных фрагментов ДНК.....	54
2.3.2.3 Биоинформатический анализ.....	56
2.3.3 Прямое мономолекулярное секвенирование ДНК.....	56
2.3.3.1 Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование.....	57
2.3.3.2 Биоинформатический анализ.....	58
2.4 Интерпретация значимости и оценка патогенности найденных генетических вариантов.....	58
2.5 Подтверждение клинически значимых генетических вариантов с помощью секвенирования по Сэнгеру.....	59
2.6 Статистический анализ данных.....	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	63
3.1 Исследование нуклеотидной изменчивости в экзонах генов саркомерных белков у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии.....	63
3.1.2 Выявленные кандидатные варианты и оценка их патогенности.....	65
3.1.2.1 Ген <i>MYBPC3</i>	65
3.1.2.2 Ген <i>MYH7</i>	71
3.1.2.3 Гены <i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> и <i>TPM1</i>	76

3.2 Исследование интронной изменчивости генов саркомерных белков у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии.....	80
3.2.1 Оценка патогенности и регуляторного потенциала некодирующих вариантов.....	80
3.2.2 Структура гаплотипов в изученных генах.....	82
3.2.2.1 Гены <i>MYBPC3</i> , <i>MYH7</i> и <i>TNNI3</i>	82
3.2.2.2 Ген <i>TNNT2</i>	86
3.2.2.3 Ген <i>TPM1</i>	92
3.3 Сравнение технологий прямого мономолекулярного секвенирования (Oxford Nanopore Technologies) и массового параллельного секвенирования (Illumina) генов саркомерных белков в образцах пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.....	102
3.4 Определение цис-положения кандидатных вариантов в гене <i>MYH7</i> у пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии.....	107
3.5 Анализ связи генотипа в генах саркомерных белков с изменчивостью клинических проявлений и эхокардиографических параметров у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.....	111
3.5.1 Описание отдельных случаев семей с редкими патогенными вариантами в генах <i>MYBPC3</i> и <i>MYH7</i>	111
3.5.2 Ассоциации полиморфизма генов саркомерных белков с выраженностью гипертрофии миокарда.....	121
3.5.2.1 Анализ ассоциаций с генотипами по отдельным однонуклеотидным вариантам.....	124
3.5.2.2 Анализ ассоциаций с гаплотипами генов <i>TNNT2</i> и <i>TPM1</i>	132
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	139
ВЫВОДЫ	148
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	153
ПРИЛОЖЕНИЕ А	189
ПРИЛОЖЕНИЕ Б	191
ПРИЛОЖЕНИЕ В	192
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	197
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	200

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – одно из наиболее частых наследственных заболеваний, её распространенность у взрослых составляет от 1:500 до 1:200. Заболевание характеризуется увеличением толщины стенок сердца, нарушением его функций, а также тяжелыми осложнениями, вплоть до внезапной сердечной смерти [Marian A.J., Braunwald E., 2017; Ommen S.R. et al., 2020; Габрусенко С.А. и др., 2020; Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021; Maron B.J. et al., 2022; Massera D. et al., 2023].

Принято считать, что ГКМП обусловлена, главным образом (40–50% случаев), мутациями в генах белков, образующих саркомер [Thakkar K. et al., 2023]. Среди них наиболее частыми причинами являются мутации в генах тяжелой цепи бета-миозина и миозин-связывающего белка С. Эти гены, *MYH7* и *MYBPC3*, экспрессируются только в миокарде. Мутации в этих генах находят примерно у 40% пациентов [Hershberger R.E. et al., 2018]. Следующими по частоте мутаций являются гены тропонина I (*TNNT2*), тропонина Т (*TNNI3*) и α -тропомиозина (*TPM1*), которые также экспрессируются только в сердце, и каждый из них ответственен примерно за 1,5-2% случаев заболевания [Elliott P.M. et al., 2014; Popa-Fotea N.M. et al., 2019; Ommen S.R. et al., 2020; Hathaway J. et al., 2021]. Однако, в 40-70% случаев заболевания выявить мутацию не удастся [Maron B.J., Maron M.S., 2013; Marian A.J., Braunwald E., 2017; Walsh R., et al., 2017; Ommen S.R., et al., 2020; Габрусенко С.А. и др., 2020; Hathaway J. et al., 2021; Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021].

Надежность оценки патогенности выявляемых в процессе генодиагностики вариантов является одной из главных проблем в современной медицинской генетике. С одной стороны, существует риск обозначения редкого полиморфизма как патогенной мутации, и комплексный анализ экзомных данных ставит под сомнение некоторые мутации, ранее считавшиеся патогенными [Andreasen C. et al., 2013]. С другой стороны, статистический анализ изменчивости генов кардиомиопатии показывает, что число вариантов «неизвестного значения» (VUS

– variant of uncertain significance) у пациентов значительно превышает долю таковых в популяциях (данные Exome Aggregation Consortium), а для некоторых генов даже превышает долю патогенных и условно патогенных вариантов [Walsh R. et al., 2017].

Показано, что гены ГКМП характеризуются очень низким уровнем полиморфизма, по сравнению со средними значениями вариабельности генома человека, с преобладанием редких и частных вариантов [Pan S. et al., 2012; Lopes L.R. et al., 2013]. В популяционных данных также встречаются варианты с вероятно патогенным эффектом [Pan S. et al., 2012; Walsh R. et al., 2017]. В последнее время все больше исследований используют статистические и биоинформатические подходы к анализу имеющихся геномных и экзомных данных, с целью оценки минимального порога частоты варианта, при котором он может быть признан патогенным [Kapplinger J.D. et al., 2014; Whiffin N. et al., 2017]. Кроме того, интенсивно развиваются методы предсказания эффекта мутаций с помощью многомерных подходов, в том числе применение нейронных сетей [Shibata A. et al., 2016; Jaganathan K. et al., 2019; Takeda J.I. et al., 2021].

Для ГКМП характерен клинический полиморфизм [Butt A.K. et al., 2023]. Учитывая вариабельность фенотипа кардиомиопатии (как моногенного или олигогенного заболевания), можно предположить, что нет четкой границы, отличающей патогенные мутации от полиморфизмов с «мягким» эффектом. При этом такие варианты с промежуточным эффектом могут усиливать механизм патологического ответа, если нарушена какая-либо из функций миокарда. Таким образом, можно предположить, что гипертензия и/или ишемия миокарда могут усиливать изначально слабый эффект вариантов в генах саркомерных белков, которые сами по себе не приводят к развитию выраженной ГКМП. Следовательно, варианты с «мягким» эффектом могут вносить вклад в развитие многофакторных заболеваний – в частности, артериальной гипертензии с гипертрофией левого желудочка. Например, ранее была выявлена ассоциация полиморфизма в гене *MYH7* с параметрами гипертрофии миокарда при артериальной гипертензии [Голубенко М.В., и др., 2002]. Для индийской

популяции, где распространен специфичный для Южной Азии полиморфизм – 25-нуклеотидная делеция в интроне гена *MYBPC3*, нарушающая сайт ветвления сплайсинга и, вероятно, усугубляющая проявление мутаций в гене *MYH7* [Waldmüller S. et al., 2003], было показано, что этот полиморфизм связан с ремоделированием левого желудочка (ЛЖ) и риском ишемической болезни сердца (ИБС) [Kumar S. et al., 2016].

Наличие у пациента двух патогенных вариантов, как в одном, так и в разных генах, обычно является неблагоприятным и обуславливает особенно тяжелое течение заболевания. Например, в родословной с двумя мутациями в гене *MYH7* (p.Val606Met и p.Ala728Val) в цис-положении было показано, что эта комбинация мутаций характеризуется более тяжелым течением кардиомиопатии и высокой вероятностью внезапной смерти (3 из 8 выявленных носителей мутаций), тогда как мутация p.Val606Met сама по себе не связана с высоким риском внезапной смерти [Blair E. et al., 2001]. Считается, что наличие двух мутаций в генах белков саркомера связано с повышенным риском внезапной смерти [Maron B.J., Maron M.S., 2013]. Описан семейный случай ГКМП с тяжелым течением заболевания у двух детей и «мягкой» клинической картиной у матери. У всех троих были найдены два патогенных варианта в генах *TTN* и *ALPK3*. У сибсов также был обнаружен вариант в гене *MYL2*. Авторы заключают, что этот случай ГКМП является «олигогенным» и обусловлен несколькими патогенными генетическими вариантами [Li L. et al., 2017].

Случай с сочетанием мутаций в генах *MYBPC3* и *MYH7* также описан у пациента с тяжелым фенотипом и ранним началом заболевания [Дземешкевич С.Л. и др., 2018]. Вместе с тем, число исследований, в которых предпринимаются попытки выявить фенотипический эффект не отдельных мутаций, а их комбинаций, в том числе комбинаций с распространенными полиморфизмами, невелико. Можно отметить работу отечественных исследователей, в которой были выявлены варианты и их комбинации, связанные с риском кардиомиопатии, а также варианты в гене *TNNT2* с протективным эффектом [Glotov A.S., et al., 2015]. В том числе показана ассоциация полиморфизма rs2250509 в гене миозин

связывающего белка H (*MYBPH*) с параметрами гипертрофии миокарда в родословной с ГКМП, вызванной мутацией p.Ala797Thr в гене *MYH7* [Mouton J.M. et al., 2016].

Исследование ассоциации редких вариантов (в том числе в комбинации с распространенными полиморфизмами) с кардиомиопатией и эхокардиографическими показателями в когортах Framingham Heart Study и Jackson Heart Study показало, что 11,2% индивидов имели редкие несинонимичные варианты в генах ГКМП, но не имели этого заболевания. У этих индивидов было выявлено статистически значимое увеличение таких эхокардиографических параметров, как толщина стенки левого желудочка и диастолический диаметр левого предсердия. Также обнаружено, что индивиды, у которых присутствовала комбинация редкого миссенс-варианта в гене *MYBPC3* (p.Arg980His, p.Arg972Trp, p.Ala216Thr или p.Arg1228Cys) и миссенс-полиморфизма rs3729799 в этом же гене, наоборот, имели толщину стенки левого желудочка на 14% меньше, чем индивиды без этих вариантов или без rs3729799, но с каким-нибудь редким миссенс-вариантом; также этот показатель у них был на 15% меньше, чем у индивидов только с rs3729799. Индивиды с редкими вариантами в саркомерных генах также характеризовались более высоким риском «неблагоприятных сердечно-сосудистых событий» (стенокардия, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность). Распространенность «патогенных» вариантов в популяции была оценена в 0,6% [Bick A.G. et al., 2012]. Приведенные данные свидетельствуют о том, что генетическая основа ГКМП (и предрасположенности к гипертрофии миокарда в целом) является комплексной.

Кроме однозначной патогенности и однозначной нейтральности вариантов существуют многочисленные градации между этими крайними значениями величины эффекта. Оценка места конкретного варианта в континууме этих градаций – также актуальная задача. В зависимости от эффекта генетический вариант может не только быть ключевым фактором для запуска заболевания (в классическом понятии мутации моногенного заболевания), но и, вероятно, может

служить дополнительным фактором-модификатором фенотипа при уже развившемся заболевании.

Мы предполагаем, что «дополнительная» изменчивость в генах ГКМП может оказывать модифицирующий эффект на фенотип этого заболевания, равно как и вносить вклад в формирование гипертрофии миокарда при артериальной гипертензии (многофакторного заболевания). Гипертрофия миокарда, как фенотип, который наблюдается и при моногенном/олигогенном и многофакторном заболевании, может служить моделью для выявления таких вариантов с промежуточным эффектом и проверки гипотезы «менделевского кода» многофакторных заболеваний, риск которого определяется в том числе и генами, вызывающими ассоциированное с ним менделевское заболевание [Blair D.R. et al., 2013].

Степень разработанности темы исследования

Большинство работ, которые проводятся в области генодиагностики ГКМП, сфокусированы на своевременном выявлении вариантов с сильным эффектом, локализованных преимущественно в экзонах генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPMI*) [Christian S. et al., 2022]. Изменчивость в интронах данных генов и ее возможная функциональная значимость при ГКМП анализируется существенно меньше [Cirino A.L. et al., 2017; Mendes de Almeida R. et al., 2017; Bagnall R.D. et al., 2018; Gomes A.C. et al., 2020]. Патогенные варианты в интронах, нарушающие сайты сплайсинга, наиболее часто регистрируются в гене *MYBPC3* [Salman O.F. et al., 2018]. Однако, помимо канонических сайтов сплайсинга, мутации в интронах могут затрагивать сайты связывания факторов транскрипции и гены некодирующих РНК, CpG-сайты (эпигенетическая регуляция активности генов), активировать криптические сайты сплайсинга, приводящие к включению фрагмента интрона в мРНК при транскрипции.

С другой стороны, вариабельность в интронах генов саркомерных белков, а именно *MYBPC3* (rs2269434) и *TNNT2* (rs10920184), показала связь с QRS-комплексом и массой миокарда левого желудочка индивидов в полногеномном

исследовании ассоциаций [van der Harst P. et al., 2016]. Не исключено, что генетическая основа ГКМП и предрасположенности к гипертрофии миокарда в результате артериальной гипертензии является комплексной, а изменчивость в генах саркомерных белков может оказывать эффект на фенотип обоих заболеваний. Однако таких исследований не было проведено ранее.

В настоящее время при генодиагностике наследственных заболеваний преобладающим методом анализа полной последовательности генов, в том числе генов саркомерных белков при ГКМП, является массовое параллельное секвенирование коротких нуклеотидных последовательностей [Wood K.A. et al., 2021]. Однако в последние годы стало доступным секвенирование длинных последовательностей ДНК в режиме реального времени, в связи с чем проводится разработка и валидация диагностических протоколов для целого ряда наследственных заболеваний с использованием технологии Oxford Nanopore Technologies [Minervini C.F. et al., 2020; Gorzynski J.E. et al., 2022; Stevanovski I. et al., 2022], но их нет для ГКМП.

В качестве нового подхода в дизайне диагностической панели генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* предполагается использовать ПЦР длинных фрагментов, которая позволяет амплифицировать полную последовательность генов, включая интроны. Такой подход сделает возможным выявление, в том числе криптических сайтов сплайсинга в интронах исследуемых генов, что позволит увеличить долю генетически объясненных случаев среди пациентов с ГКМП. Кроме того, будут получены данные о полиморфизме исследуемых генов, которые могут быть использованы в дальнейшем для исследований, направленных на выявление дополнительных генетических факторов, влияющих на тяжесть течения данного заболевания.

Генетические аспекты кардиомиопатий, включая ГКМП, рассматриваются в целом ряде работ [Nishi H. et al., 1995; Костарева А.А. и др., 2003; Заклязьминская Е.В. и др., 2005; Шляхто Е.В., и др., 2005; Laredo R. et al., 2006; Bashyam M.D. et al., 2007; Rai T.S. et al., 2009; Waldmüller S. et al., 2011; Marsiglia J.D. et al., 2013; Zou Y. et al., 2013; Ниязова С.С. и др., 2014; Sedaghat-Hamedani F. et al., 2018;

Hershkovitz T. et al., 2019; Ниязова С.С. и др., 2019; Стрельцова А.А., и др., 2019; Дземешкевич С.Л. и др., 2019; Chung H. et al., 2020; Blagova O. et al., 2020; Никулина С.Ю. и др., 2021; de Feria A.E. et al., 2021; Затейщиков Д.А. и др., 2022; Шестак А.Г., и др., 2000, 2022; Вахрушев Ю.А. и др., 2022; Иванова А.А. и др., 2022; Chumakova O.S., Baulina N.M., 2023]. Например, в результате наблюдения за пациентами с ГКМП и носителями патогенных мутаций в генах *MYH7* и *MYBPC3* были установлены: большее количество хирургических вмешательств, более высокий риск внезапной смерти и более короткая продолжительность жизни у пациентов с патогенными вариантами в гене *MYH7*, по сравнению с пациентами с вариантами в гене *MYBPC3*; в течение 6 лет наблюдения у 26% носителей патогенных вариантов в гене *MYH7* были зарегистрированы клинические проявления ГКМП, в то время как носители вариантов в гене *MYBPC3* оставались бессимптомными [Wang S. et al., 2008]. По данным мета-анализа (который включал 51 исследование с 7675 пациентами с ГКМП) патогенные варианты в гене *MYH7* в среднем приводят к более раннему развитию ГКМП и более тяжелому ее течению, в сравнении с больными ГКМП, связанной с другими генами, а частота нарушений сердечной проводимости, желудочковой аритмии и трансплантации сердца выше у пациентов с патогенными вариантами в гене *MYH7*, чем с вариантами в гене *MYBPC3* [Sedaghat-Hamedani F. et al., 2018]. Начало заболевания у носителей патогенных вариантов в генах саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNI3*, *ACTC1*, *TNNC1*) более раннее, чем у тех, у кого не было выявлено мутаций в этих генах [de Feria A.E. et al., 2021]. Однако, с учетом небольшого числа пациентов, обладающих одной и той же мутацией, по-прежнему остается нерешенным ряд вопросов не только о патогенности некоторых вариантов в отношении развития ГКМП, но и условий, способствующих развитию патологического фенотипа и определяющих клиническое течение болезни.

Несмотря на то, что связь генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) с развитием ГКМП является доказанной [Ingles J. et al., 2019], актуальным является установление степени патогенности их генетических

вариантов и оценка гено-фенотипических корреляций при гипертрофии миокарда различного генеза в определенных этнических группах. В частности, в ряде случаев варианты, которые на начальных этапах исследования относились к категории «доброкачественных», т.е. не патогенных, в дальнейшем выявлялись у пациентов с ГКМП с тяжелой формой ее течения [Van Driest S.L. et al., 2002; Mori A.A. et al., 2021].

Следует отметить, что в работах лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ активно изучается концепция заболеваний сердечно-сосудистого континуума, объединенных схожим патогенезом с вовлечением единой группы генов [Пузырев В.П. и др., 2003; Пузырев В.П., 2015; Брагина Е.Ю., Пузырев В.П., 2023]. В результате был охарактеризован спектр мутаций в генах саркомерных белков у пациентов с ГКМП [Голубенко М.В. и др., 2002; Puzyrev K.V. et al., 2002]. С использованием кандидатного подхода показана ассоциация полиморфизма генов саркомерных белков с ремоделированием сердца у пациентов, имеющих артериальную гипертензию [Макеева О.А. и др., 2004]. Однако не был выполнен детальный анализ варибельности полной нуклеотидной последовательности генов саркомерных белков при обоих фенотипах. Фенотипический эффект не отдельных редких клинически значимых вариантов, а их комбинаций, в том числе комбинаций с распространенными полиморфизмами, остаётся неизвестным. Решение данных задач становится возможным с появлением новых технологий и подходов.

Цель исследования

Идентификация вариантов в генах саркомерных белков, определяющих формирование фенотипа гипертрофии миокарда различного генеза.

Задачи исследования

1. Исследовать нуклеотидную изменчивость полной последовательности генов *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с компенсаторной гипертрофией миокарда при артериальной

гипертензии с помощью массового параллельного и нанопорового секвенирования; классифицировать выявленные генетические варианты по степени патогенности.

2. Описать вариабельность интронных последовательностей изучаемых генов с целью выявления потенциально неблагоприятных вариантов, локализованных в функционально значимых регионах.

3. У индивидов, имеющих более чем один неблагоприятный вариант в одном гене, определить гаплотипы (цис/транс положение этих вариантов) с помощью прямого секвенирования длинных фрагментов ДНК.

4. Охарактеризовать связь нуклеотидной изменчивости изучаемых генов с эхокардиографическими параметрами миокарда пациентов.

Научная новизна исследования

Впервые исследована полная нуклеотидная последовательность генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*), включая интроны, с помощью технологий массового параллельного и мономолекулярного секвенирования. Впервые с помощью методов секвенирования третьего поколения проведено прямое определение гаплотипов исследуемых генов саркомерных белков при ГКМП и гипертрофии миокарда ЛЖ при АГ. Проверена гипотеза о вкладе вариантов генов менделевских заболеваний в развитие многофакторной патологии на примере группы пациентов с компенсаторной гипертрофией миокарда в результате АГ. Впервые установлена применимость использования технологии секвенирования третьего поколения Oxford Nanopore Technologies в практических целях генодиагностики ГКМП. Выявлены ассоциации частых вариантов генов саркомерных белков с вариабельностью количественных характеристик гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП. В качестве нового подхода в дизайне диагностической панели «частых» генов ГКМП (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) была использована ПЦР длинных фрагментов с амплификацией полной последовательности генов, включая интроны, позволяющая выявлять в т. ч. криптические сайты сплайсинга,

что может увеличить долю пациентов с установленной генетической причиной ГКМП.

Теоретическая и практическая значимость

Охарактеризован спектр мутаций в генах саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) у пациентов с ГКМП, проживающих в Сибирском федеральном округе. Генетическая причина заболевания установлена у 26% пациентов с ГКМП в изучаемой выборке. Разработана панель праймеров, использованная для амплификации полной последовательности генов, и подана заявка на патент. Выявлены генотипы, имеющие рисковый или протективный эффект в отношении развития гипертрофии миокарда у пациентов с ГКМП, а также ассоциированные с эхокардиографическими параметрами и характеристиками механики ЛЖ. Комплексный анализ данных на основе подробного эхокардиографического изучения и описания строения ЛЖ, механики его работы и изменений, происходящих при изучаемой патологии, наряду с данными об изменчивости генов, отвечающих за наследственную компоненту, позволил оценить степень патогенности определенных мутаций в генах саркомерных белков. Полученные результаты имеют ценность для развития подходов к молекулярно-генетической диагностике одного из наиболее частых наследственных заболеваний – ГКМП, в том числе с использованием нанопорового секвенирования. Полученные данные о полиморфизме генов могут быть использованы для исследования дополнительных генетических факторов, влияющих на тяжесть течения ГКМП и гипертрофии миокарда ЛЖ при АГ, что важно учитывать в персонифицированном подходе определения прогноза и формирования групп риска данной патологии.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе использованы современные методы клинического и параклинического обследования пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и гипертрофией миокарда левого желудочка при артериальной гипертензии, а

также молекулярно-генетического, биоинформатического и статистического анализа.

Выборки пациентов с гипертрофией миокарда различного генеза сформированы на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ (отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, заведующий отделением – д.м.н., профессор Павлюкова Е.Н.). Массовое параллельное секвенирование и подготовка ДНК-библиотек с помощью TruSight Cardiomyopathy Sequencing Panel (Illumina, США) для 12 пациентов с ГКМП проводилось в сотрудничестве с коллегами из Санкт-Петербурга (СПБ ГБУЗ Городская Больница №40 - руководитель сектора клинико-генетических исследований, д.б.н., О.С. Готов), а набора SureSelect Focused Exome (Agilent, США) для 15 пациентов с ГКМП – с лабораторией эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (заведующий – д.б.н, профессор Закиян С.М.). Анализ цис-/транс- положения нескольких клинически значимых вариантов в гене *MYH7* проведен с использованием образца ДНК пациента с ГКМП, полученном из лаборатории медицинской генетики ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского» (рук. лаб. – д.м.н. Заклязьминская Е.В.).

Работа проводилась с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с Федеральным законом «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 N 323-ФЗ. Перед началом исследования было получено разрешение комитетов по биомедицинской этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол №151 от 22.12.2016 г.) и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол №4 от 25.11.2019 г.).

Молекулярно-генетические методы включали ПЦР длинных фрагментов, массовое параллельное секвенирование, нанопоровое мономолекулярное секвенирование, секвенирование по Сэнгеру. Оценка патогенности выявленных генетических вариантов охарактеризована с учетом стандартов и критериев по интерпретации вариантов секвенирования Американской Коллегии Медицинской Генетики/Ассоциации Молекулярной Патологии (ACMG/AMP) [Richards S. et al., 2015], руководства по интерпретации данных высокопроизводительного

секвенирования [Рыжкова О.П. и др., 2019], онлайн-калькуляторов, созданных в Медико-генетическом научном центре РАН [<http://calc.generesearch.ru/>] и реализованного на сайте VarSome [Kopanov S. et al., 2019; <https://varsome.com/>], а также специализированных для кардиомиопатий рекомендаций [Elliott P.M. et al., 2014; Ommen S.R. et al., 2020].

В ходе выполнения диссертационной работы использован широкий спектр методов биоинформационного и статистического анализа данных, в том числе GATK, Annovar, CADD, Guppy, Nanopolish, Clair3, Medaka, HMDD, Varsome, VannoPortal, RUSeq, GnomAD, Genotype-Tissue Expression (GTEx) project, GWAS catalog, RegulomeDB, AlphaFold Protein Structure Database, ADAstra, TargetScan, RBPmap, RNAfold, Haploview, Statistica.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК1093.2020.7 (проведение мономолекулярного секвенирования образцов ДНК пациентов с ГКМП, биоинформатическая обработка данных), РФФИ в рамках научного проекта № 20-315-90059 (выполнение подтверждающего секвенирования выявленных вариантов у пациентов и членов семьи с помощью секвенирования по Сэнгеру) и ПНИ № АААА-А20-120041490002-9 (медико-генетическое консультирование, подбор праймеров и условий для ПЦР).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Технология мономолекулярного секвенирования имеет потенциал для диагностики гипертрофической кардиомиопатии, особенно в случае фазирования кандидатных вариантов.
2. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и гипертрофией миокарда левого желудочка при артериальной гипертензии гены *TPM1* и *TNNT2* характеризуются наличием гаплотипов, образованных несколькими потенциально функциональными некодирующими вариантами, которые находятся в сильном неравновесии по сцеплению.

3. Варианты пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TRPM1*) – синонимичные и варианты в некодирующих областях, а также образованные ими гаплотипы, ассоциированы с изменчивостью эхокардиографических параметров у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных и адекватных методов клинического и параклинического обследования, в том числе такими молекулярно-генетическими технологиями как массовое параллельное и нанопоровое мономолекулярное секвенирование, привлечением внешних данных из открытых источников и баз (ClinVar, Varsome, HMDD, NCBI и др.), валидацией результатов секвенирования с помощью альтернативных методов (секвенирование по Сэнгеру), а также использованием релевантных методов математической статистики и биоинформатики.

Апробация результатов работы

Результаты работы были представлены на 5 конференциях: научно-практической конференции «Редкие болезни в практике врачей разных специальностей» (2021 г.), Втором всероссийском научно-образовательном форуме с международным участием «Кардиология XXI века: альянсы и потенциал» (2021 г.), Российском национальном конгрессе кардиологов (2022 г.), конференции Европейского общества генетики человека (Conference European Society of Human Genetics, 2022 г.), XIII научной конференции «Генетика человека и патология», посвященной 40-летию НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (2022 г.).

Публикации

Основные результаты по теме диссертации изложены в 6 публикациях, из которых 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, в том числе 3 из них

реферируются в базах Web of Science/Scopus. По одной публикации – статья в сборнике методических рекомендаций и тезисы конференции.

Личный вклад

Работа выполнена в лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ. Основные результаты настоящего исследования получены автором самостоятельно. Изучение литературы по теме диссертации, анализ и статистическая обработка собственных результатов, а также написание диссертации выполнено лично автором. Автор участвовал во всех этапах обсуждения полученных результатов и их опубликования.

Объем и структура диссертации

Работа состоит из введения, трех глав, заключения и пяти приложений. Полный объем диссертации составляет 201 страницу, включая 35 рисунков и 13 таблиц. Список литературы содержит 315 источников из них 25 источников отечественной и 267 источников зарубежной литературы, а также 23 интернет-ресурса.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Гипертрофическая кардиомиопатия: определение, историческая справка, классификация

В настоящее время под гипертрофической кардиомиопатией (ГКМП) понимают генетически обусловленное заболевание миокарда, при котором регистрируют гипертрофию миокарда левого и/или правого желудочков (более 1,5 см) у взрослых, чаще асимметричного характера вследствие утолщения межжелудочковой перегородки, что не может быть объяснено исключительно повышенной нагрузкой давлением, и возникающую при отсутствии другого сердечного или системного заболевания, метаболического или полиорганного синдрома, связанного с гипертрофией левого желудочка (ГЛЖ) [Габрусенко С.А., и др., 2021].

ГКМП - это самое распространенное наследственное заболевание сердца и одно из самых часто регистрируемых генетических заболеваний в целом (распространенность по разным оценкам составляет от 1:500 до 1:200 без явных различий по странам) [Ommen S.R. et al., 2020; Габрусенко С.А. и др., 2020; Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021; Maron B.J. et al., 2022]. В то же время, с учетом бессимптомного носительства патогенных вариантов в генах ГКМП и проявления патологии только случаями внезапной сердечной смерти, можно предположить, что оценки распространенности данной формы кардиомиопатии занижены. У взрослых при ГКМП летальность может составлять от 1 до 4% в год, однако эти оценки снижаются благодаря совершенствованию методов диагностики и лечения данной патологии [Maron B.J., Maron M.S., 2013; Basit H. et al., 2021]. В частности, современные стратегии лечения ГКМП привели к снижению как заболеваемости, связанной с ГКМП, так и смертности (до 0,5% в год) [Maron B.J. et al., 2022].

Для ГКМП характерна высокая клиническая вариабельность [Arad M. et al., 2002; Díez-López C., Salazar-Mendiguchía J., 2018]. Клиническое течение заболевания разнообразно: бессимптомное течение, заканчивающееся внезапной

сердечной смертью (которая становится первым признаком патологии); заболевание может проявляться слабостью, одышкой при физической нагрузке, болью в груди, чувством учащенного сердцебиения, субъективным ощущением неправильной работы сердца (пальпитациями), аритмиями [Marian A.J., Braunwald E., 2017].

Наиболее часто манифестация ГКМП происходит на третьем десятилетии жизни, но может проявляться в любом возрасте (данная патология выявляется и у новорожденных, и у пожилых пациентов); морфологические нарушения сердца обнаруживаются примерно у 25% ближайших родственников пациентов с ГКМП [Basit H. et al., 2021]. ГКМП считается наиболее частой причиной внезапной сердечной смерти лиц молодого возраста и молодых спортсменов, может привести к функциональной нетрудоспособности в результате сердечной недостаточности и инсульта [Maron B.J., Maron M.S., 2013; Maron B.J., Haas T.S., 2016; Gati S., Sharma S., 2022]. Высокая распространенность и тяжелые медико-социальные последствия данной кардиомиопатии обусловили пристальный интерес ученых и клинических специалистов к ее исследованию по различным направлениям.

1.1.1 История изучения гипертрофической кардиомиопатии

История изучения ГКМП насчитывает несколько веков (Таблица 1). Первое описание данного патологического фенотипа было сделано Морганьи Д. и Ланцизи Д. в XVII веке [Coats C.J., Hollman A., 2008; Liew A.C. et. al., 2017]. Затем на протяжении нескольких веков (до середины XX века) исследовались клинические особенности ГКМП.

С появлением медицинской периодической литературы основные характеристики ГКМП (гипертрофия неясного генеза, семейный характер болезни, обструкция выносящего тракта левого желудочка (ВТЛЖ)) стали широко известны по всему миру, а благодаря развитию методов было сформировано понимание патофизиологии болезни.

Таблица 1. Основные этапы истории изучения гипертрофической кардиомиопатии

Исторический период		Исследователи	Основные наблюдения/положения	
XVII век		Морганьи Д., Ланцизи Д.	Описание классических симптомов, морфологическое описание. Описание семейных случаев заболеваний сердца.	
XIX век	Первая половина	Чеверс Н., Вюльпиан А.	Выделение термина "субаортальный синдром", начало формирования международного консенсуса.	
	Вторая половина	Сойка И., Питт Н., Помпе И.	Описаны симптомы ГКМП у пациентов с наследственными синдромами.	
XX век	Первая половина	Хауленд Д., Жосерранд Е., Галлавардин Л.	Описание идиопатической гипертрофии и стенозирующих состояний сердца.	
	Вторая половина	Тир Д. с соавторами	Объединение в одну нозологическую единицу идиопатической гипертрофии сердца и обструкции выносящего тракта левого желудочка.	Определение наследственной природы заболевания, типа наследования, разработка диагностики и лечения.
		Паре Ж. П. с соавторами	Анализ сцепления и картирование первого локуса ГКМП	Формирование понимания патоморфологических процессов.
		Гайстерфер-Лоуренс А.А. с соавторами	Впервые обнаружена мутация в гене <i>MYH7</i> у пациента с ГКМП. Объяснение патогенеза ГКМП.	
XXI век		Мейрон Б, Маккенна В., Перри Э. и другие; научно-исследовательские коллективы разных стран мира	Уточнение генетической природы, патогенетических механизмов, методов диагностики и лечения.	

Так, в первой половине XIX века Чеверс Н. описал очаговый субаортальный стеноз [Chevers N., 1842], а Вюльпиан А. ввел термин «субаортальный синдром»

[Vulpian A., 1868]. Ко второй половине XIX века относятся первые описания наследственных случаев ГКМП. Например, патологоанатом Александр Шминке установил врожденный характер заболевания, предложил термин «первичный мышечный стеноз конуса» и предположил, что это состояние может протекать бессимптомно на протяжении всей жизни, а также являться причиной множества описанных в литературе случаев необъясненной идиопатической гипертрофии сердца [Schmincke A., 1907].

В 1947 г. Уильям Эванс привлек внимание общественности к новой нозологической единице, характеризующейся кардиомегалией, нарушениями ритма, внезапной смертью и предложил термин «семейная кардиомегалия» [Evans W., 1949]. Важный вклад в изучение ГКМП внес судебно-медицинский эксперт Дональд Тир, объединивший все изученные и описанные проявления в то, что сейчас известно как наследственная гипертрофическая кардиомиопатия. Так, в 1958 году он опубликовал ставшую классической работу, в которой описал 8 случаев «ассиметричной гипертрофии или мышечной гамартомы» у восьми людей молодого возраста, семь из которых умерли внезапно. Также было установлено, что частым проявлением патологии были palpitations, головокружение, обмороки, а морфологически в сердце отмечалась дезорганизация мышечных пучков и гипертрофия отдельных мышечных волокон [Teare D., 1958].

Неоценимый вклад в изучение молекулярной основы ГКМП внес Ж. Питер Паре. В 1961 году он с соавторами описал случаи гипертрофии сердца в большой франко-канадской семье, располагавшей 100-летним генеалогическим древом [Pare J.A., et al., 1961]. А почти 30 лет спустя в этой родословной был проведен анализ сцепления и картирован первый локус ГКМП на 14-й хромосоме [Jarcho J.A. et al., 1989]. За этим последовало обнаружение мутации p.Arg403Glu в гене *MYH7*, что стало настоящим прорывом в изучении данного заболевания и позволило установить молекулярную основу ГКМП [Geisterfer-Lowrance A.A. et al., 1990]. В дальнейшем обнаружены несколько сотен мутаций в генах саркомерных белков [Watkins H. et al., 2008]. С тех пор, по мере развития

технологий молекулярно-генетической диагностики, число патогенных мутаций, и генов, ассоциированных с ГКМП, продолжает увеличиваться, и на данный момент в базе Simple ClinVar насчитывается более 8800 вариантов в более чем 120 генах [Pérez-Palma E. et al., 2019].

В настоящее время параллельно проводятся исследования ГКМП по разным направлениям: изучаются клинические особенности у пациентов с ГКМП, совершенствуются клинические критерии диагностики и методы лечения; ведется поиск генетических факторов, приводящих к развитию данной патологии сердечной мышцы, участвующих в определении клинической картины и исходов заболевания; исследуются гено-фенотипические корреляции, а также разрабатываются подходы диагностики и прогноза течения ГКМП на основании молекулярно-генетических маркеров [Комиссарова С.М. и др., 2018; Леднев П.В. и др., 2019; Стрельцова А. А. и др., 2019; Basit H. et al 2021; Maron B.J. et al., 2021; Antoniutti G. et al., 2022].

В РФ генетические аспекты кардиомиопатий, включая ГКМП, активно изучаются в Российском научном центре хирургии им. акад. Б.В. Петровского [Заклязьминская Е.В. и др., 2005; Дземешкевич С.Л. и др., 2019; Vlagova O. et al., 2020; Шестак А.Г. и др., 2022], Национальном медицинском исследовательском центре им. В.А. Алмазова [Костарева А.А. и др., 2003; Шляхто Е.В., и др., 2005; Стрельцова А.А., и др., 2019; Вахрушев Ю.А. и др., 2022], Национальном медицинском исследовательском центре кардиологии им. акад. Е.И. Чазова [Затейщиков Д.А. и др., 2022; Chumakova O.S., Baulina N.M., 2023], Научно-исследовательском институте терапии и профилактической медицины - филиал ФИЦ ИЦиГ СО РАН и Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого [Никулина С.Ю. и др., 2021; Иванова А.А. и др., 2022].

В конце XX-го века в НИИ медицинской генетики были начаты исследования в области генетики кардиологических заболеваний, в том числе гипертрофической кардиомиопатии [Голубенко М.В. и др., 2002; Puzyrev K.V. et al., 2002; Пузырев В.П. и др., 2003; Salakhov R.R, et al., 2022; Кучер А.Н., и др.,

2023]. Под руководством академика РАН, профессора Пузырева В.П. развивается концепция заболеваний сердечно-сосудистого континуума - объединенных схожим патогенезом с вовлечением единой группы генов [Пузырев В.П. и др., 2003; Пузырев В.П., 2015; Брагина Е.Ю., Пузырев В.П., 2023]. С использованием кандидатного подхода показана ассоциация полиморфизма генов саркомерных белков с ремоделированием сердца у пациентов, имеющих артериальную гипертензию [Макеева О.А. и др., 2004]. Выполнены работы по анализу ассоциаций полиморфизма митохондриальной ДНК с изменчивостью количественных признаков, характеризующих состояние сердечно-сосудистой системы [Буйкин С.В. и др., 2005].

1.1.2 Классификация гипертрофической кардиомиопатии

В основу классификации ГКМП могут быть положены различные подходы (Таблица 2). Принципы классификации основываются на оценке величины показатели градиента давления (ГД) в ВТЛЖ и морфопатологических особенностей сердца [Габрусенко С.А. и др., 2020]; клинической картины [Rowin E.J. et al., 2017; Стрельцова А. А. и др., 2019], а также учете семейного анамнеза или молекулярно-генетического обследования [Ingles J. et al., 2017].

Клинические и диагностические признаки, которые применяются для формирования групп при исследовании, имеют значение для вероятности выявления причинных генетических вариантов развития ГКМП. Показано, что к числу клинических показателей, повышающих вероятность выявления диагностического генетического варианта относятся: более ранний возраст постановки диагноза ($p < 0,0001$), более высокая максимальная толщина стенки ЛЖ ($p < 0,0001$), положительный семейный анамнез ($p < 0,0001$), отсутствие артериальной гипертензии ($p = 0,0002$) и наличие имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора ($p = 0,0004$) [Ingles J. et al., 2019]. В то же время отсутствие семейного отягощения не может рассматриваться в качестве исключения генетической основы ГКМП.

Таблица 2. Подходы к классификации гипертрофической кардиомиопатии

Принцип классификации	Клинический фенотип	Диагностический критерий
Гемодинамический	Необструктивная	ГД в ВТЛЖ менее 30 мм рт.ст.,
	Обструктивная	ГД в ВТЛЖ более 30 мм рт.ст.,
	Латентная обструкция	ГД в ВТЛЖ менее 30 мм рт.ст. в покое и более 30 мм рт.ст. при нагрузке
Морфологический	Асимметричная форма	Морфологически можно выделить регион сердца с наиболее выраженной гипертрофией
	Симметричная форма	Гипертрофия равномерна в разных регионах сердца
Степень выраженности гипертрофии	Умеренная форма	Максимальная толщина стенки ЛЖ менее 18 мм
	Промежуточная форма	Максимальная толщина стенки ЛЖ более 18, но менее 30 мм
	Экстремальная форма	Максимальная толщина стенки ЛЖ равна или превышает 30 мм
Клиническая картина	Малосимптомное течение	Не регистрируются симптомы, характерные для ГКМП
	Симптомное течение	Регистрируют различные сочетания клинических проявлений, таких как внезапная сердечная смерть, хроническая сердечная недостаточность, фибрилляция предсердий
	Субклиническое течение	Выделяют у генотип-позитивных пациентов с толщиной миокарда, не превышающей 13 мм, у которых регистрируют такие признаки ГКМП, как множественные миокардиальные крипты, удлинение передней створки митрального клапана и аномальные
Отягощенность семейного анамнеза	Семейная форма	трабекулы
	Несемейная форма	Нет сведений о родственниках с диагнозом ГКМП, отрицательный результат молекулярно-генетического исследования как минимум семи генов саркомерных белков

Продолжение Таблицы 2. Подходы к классификации гипертрофической кардиомиопатии

Принцип классификации	Клинический фенотип	Диагностический критерий
Тип наследования	Аутосомно-доминантный	
	Аутосомно-рецессивный	
	Дигенный доминантный	
	Митохондриальное наследование	
Гены, несущие патогенные варианты	Гены саркомерных белков (<i>MYBPC3</i> , <i>MYH7</i> , <i>TNNT2</i> , <i>TNNI3</i> , <i>TPM1</i> и др.)	
	Нарушения в митохондриальном геноме (<i>MT-ND1</i> , <i>MT-ND5</i> , <i>MT-TK</i> , <i>MT-TH</i> и др.)	
	Гены врожденных ошибок метаболизма (<i>GAA</i> , <i>LAMP2</i> , <i>GLA</i> , <i>PRKAG2</i> , <i>SLC22A5</i> и др.)	
	Синдромальные формы (<i>PTPN11</i> , <i>KRAS</i> , <i>SOS1</i> , <i>HRAS</i> , <i>BRAF</i> и др.)	

Примечание. Составлено по [Ingles J. et al, 2017; Rowin E.J., Maron M.S., 2017; Стрельцова А. А. и др., 2019; Габрусенко С.А. и др., 2020; OMIM].

С генетической точки зрения ГКМП может классифицироваться в зависимости от характера наследования (аутосомно-доминантный, аутосомно-рецессивный тип наследования, митохондриальное наследование), числа генов, лежащих в основе развития ГКМП (моногенная, олигогенная, многофакторная формы), а также функции белковых продуктов генов, варианты в которых выступают в качестве причинных.

Согласно «моногенной гипотезе», которая возникла около 30 лет назад, единственный генетический вариант в одном или нескольких генах саркомерных белков ответственен за все проявления патогенеза ГКМП. Наиболее часто ГКМП рассматривают как моногенное заболевание сердца, с огромным множеством различных мутаций [Maron B.J. et al., 2019]. Благодаря этой гипотезе, во-первых, опираясь на генетическую основу, такое клинически гетерогенное состояние как ГКМП, было сведено в одну нозологическую единицу. Во-вторых, была установлена парадигма, в рамках которой только лишь мутации в генах саркомера

определены основными, если не единственными, этиологическими факторами. Важно отметить, что такая парадигма продолжает получать широкую поддержку, несмотря на ее неспособность объяснить определенные механистические аспекты ГКМП, такие как взаимодействие между нарушением регуляции энергетических функций сердца и повышенной сократимостью ЛЖ, а также интерстициальным и периваскулярным фиброзом [Sweeney H.L. et al., 1998]. Кроме того, новые данные, полученные в результате анализа обширных генетических баз данных популяций, показали, что некоторые мутации, изначально считавшиеся патогенными, с относительно высокой частотой встречаются и у клинически здоровых лиц [Bick A.G. et al., 2012; Manrai A.K. et al., 2016]. В данном случае актуальным является уточнение патогенетической значимости данных вариантов, так как для ГКМП характерно и бессимптомное носительство патогенных вариантов [Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021]. Кроме того, важно выявлять условия, при которых проявляются патологические эффекты таких вариантов.

Одним из возможных условий проявления патогенных вариантов при ГКМП может рассматриваться наличие других вариантов как в генах саркомерных белков, так и в других генах, функционально связанных с работой сердца. Такие исследования накапливаются и все чаще о ГКМП говорят как об «олигогенной» патологии [Комиссарова С.М., Чакова Н.Н., 2018; Harper A.R. et al. 2021; OMIM]. Например, описаны дигенные доминантные формы для ГКМП, вызванной мутациями в гене *CAV3*, а также мутациями в генах *MYH7* и *MYLK2* [OMIM]. Сочетание нескольких неблагоприятных вариантов в одном или разных генах могут не только лежать в основе развития ГКМП, но и сказываться на клинической картине болезни [Marian A.J., Braunwald E., 2017]. Так, показано, что наличие двух и более мутаций ведет к более тяжелой клинической картине ГКМП, в отличие от ситуации, когда имеется лишь одна из этих мутаций [Blair E. et al., 2001; Marian A.J., Braunwald E., 2017].

Как правило, ГКМП является аутосомно-доминантным (АД) заболеванием, но выделяют также аутосомно-рецессивные (АР) и дигенные доминантные формы [Hartmannova H. et al., 2013; OMIM]. Так, недавно было обнаружено, что ГКМП,

обусловленная мутациями в гене *TRIM63*, наследуется аутосомно-рецессивно [Andreeva S. et al., 2022]. По данным ресурса ClinGen, ГКМП, вызванная патогенными вариантами в гене *ALPK3*, наследуется аутосомно-рецессивно [Ingles J. et al., 2019], а согласно информации, представленной в OMIM, AP и АД формы зарегистрированы для ГКМП, причиной которой являются мутации в генах *MYBPC3* и *MYL3*. Гипертрофия миокарда может также быть одним из проявлений множества метаболических синдромов [Elliott P.M. et al., 2014]. Х-сцепленное наследование характерно для фенокопий ГКМП, например, болезни Фабри [Marian A.J., 2016].

Согласно некоторым исследователям [Elliott P.M. et al., 2014], помимо мутаций в генах саркомерных белков, примерно в 5–10% случаев к развитию гипертрофии сердца могут приводить другие генетические и негенетические факторы. Не исключено, что варианты в генах метаболических синдромов, одним из проявлений которых является гипертрофия миокарда, могут влиять на клинические проявления ГКМП у пациентов с мутациями в генах саркомерных белков, что требует самостоятельного исследования.

То, что могут существовать дополнительные гены, варианты которых модифицируют клиническую картину ГКМП у носителей мутаций в генах саркомерных белков, подтверждается как особенностями патогенеза данного заболевания, так и экспериментальными данными. Так, патогенез ГКМП включает в себя три основных составляющих, ведущих к повреждению миокарда: гипертрофия кардиомиоцитов, нарушение их организации и фиброз миокарда. Помимо мышечной ткани, повреждаются также и сосуды микроциркуляторного русла, средняя оболочка которых утолщается, что приводит к сужению просвета и, как следствие, нарушению обменных процессов в миокарде [Maron B.J. et al., 2019]. Повреждение миокарда и его гипертрофия ведет к диастолической (снижению наполнения камер сердца) и систолической (увеличивается фракция выброса) дисфункциям. Гипертрофированный миокард может оказывать негативный эффект на насосную функцию сердца: часто наблюдаемая ассиметричная гипертрофия приводит к обструкции ВТЛЖ, повышению давления

крови в желудочке и увеличению скорости потока крови. Возникающий в таких условиях эффект Вентури втягивает створку митрального клапана (в то же время, одним из характерных признаков ГКМП является увеличение длины створок клапанов), что приводит к вторичной его недостаточности и регургитации крови в предсердие [Marian A.J., Braunwald E., 2017; Ommen S.R. et al. 2020]. Иными словами, в развитие клинической картины могут вовлекаться и метаболические пути, задействованные в поддержании гомеостаза на разных уровнях организации сердца. Так, при проведении GWAS [Harper A.R. et al. 2021] установлено сильное полигенное влияние на риск развития патологии, особенно для саркомер-негативной ГКМП, а у носителей патогенных вариантов в генах саркомера – на тяжесть течения. Эти данные свидетельствуют о возможной полигенной природе ГКМП, по крайней мере, в отдельных случаях.

1.2 Гены «гипертрофической кардиомиопатии»

ГКМП характеризуется ярко выраженной генетической гетерогенностью, то есть большое число вариантов в десятках генов могут приводить к ее развитию. В курируемой базе данных ClinGen приведены 13 генов, для которых доказана вовлеченность в формирование фенотипа ГКМП, а для 15 генов доказательства этого «ограничены» (Таблица 3) [Ingles J. et al., 2019].

Таблица 3. Гены, ассоциированные с гипертрофической кардиомиопатией, по данным ClinGen

Доказанность	Гены	Общее число генов
Установленная	<i>MYBPC3, TPM1, MYL2, ACTC1, MYL3, MYH7, TNNT2, TNNI3, PRKAG2</i>	9
Сильная	<i>ALPK3</i>	1
Умеренная	<i>JPH2, TNNC1, CSRP3</i>	3
Ограниченная	<i>MYPN, MYLK2, TCAP, RYR2, VCL, PDLIM3, CALR3, MYOZ2, NEXN, KLF10, MYOM1, MYH6, TRIM63, TTN, ANKRD1</i>	15

Тринадцать генов, отнесенных в базе ClinGen к генам ГКМП, характеризуются разной степенью «доказанности». Установленной (доказанной) признана связь с ГКМП для 9 генов, сильной – для одного гена, умеренной – для 3 генов [Ingles J. et al., 2019]. Среди 9 генов с установленной связью с ГКМП, 8 кодируют белки саркомерного комплекса, и эксперты Европейского Общества Кардиологии (ESC) [Elliott P.M. et al., 2014], Американской Коллегии Кардиологов (ACC) и Американской Ассоциации Сердца (АНА) [Ommen S.R. et al., 2020] и Российского кардиологического общества [Габрусенко С.А., и др., 2020] в своих клинических рекомендациях главную роль в этиологии ГКМП отводят мутациям именно в генах саркомерных белков.

В то же время, по данным других источников, к категории значимых для патогенеза ГКМП может быть отнесено большее число генов. В базе данных Simple ClinVar для ГКМП приведены 123 гена с 8879 вариантами, в том числе 427 патогенных вариантов локализованы в 29 генах, 408 вероятно патогенных вариантов локализованы в 31 гене, а 5626 вариантов с неопределенной значимостью локализованы в 110 генах (Таблица 4) [Pérez-Palma E. et al., 2019; <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>]

Таблица 4. Гены и генетические варианты, связанные с гипертрофической кардиомиопатией, согласно базе данных Simple ClinVar

Эффект вариантов	Гены	Всего генов	Всего вариантов
Патогенные	<i>MYBPC3, MYH7, TNNI3, TNNT2, LAMP2, PRKAG2, TCAP, MYL2, ACTC1, ACTN2</i> и др.	29	427
Вероятно патогенные	<i>MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, MYL2, TPM1, LAMP2, PRKAG2, GLA, TTN</i> и др.	31	408
С неопределенной значимостью или «конфликтные» (отнесенные разными исследователями к разным категориям)	<i>MYH7, MYBPC3, MYH6, ACTN2, MYOM1, ACTC1, TNNT2, TNNI3, TPM1, TTN</i> и др.	110	5626

В частности, Комиссаровой С.М. с соавторами [Комиссарова С.М. и др., 2018] у 72,2% пациентов с ГКМП с высоким риском внезапной сердечной смерти (ВСС) по шкале HCM-Risk SCD были выявлены ранее описанные мутации и замены с неустановленной клинической значимостью (в гене *MYH7* – p.Val186Leu, p.Arg403Trp, p.Lys450Glu, p.Val606Met, p.Arg663Cys и p.Glu924Lys; в гене *MYBPC3* – p.Asp610Asn в сочетании с p.Pro1066Arg, p.Trp1214Arg, p.Gln1233*, p.Glu1265Val в комбинации с p.Cys1266Arg, а также две мутации в гене *MYBPC3* (p.Tyr1043* и p.Arg1138fs) описаны первые. У каждого второго пациента с ГКМП с низким и промежуточным риском ВСС по шкале HCM-Risk SCD также выявлены описанные ранее единичные и сочетанные мутации и замены с неустановленной клинической значимостью в генах *MYH7*, *MYBPC3* и *ACTC1* [Комиссарова С.М. и др., 2018]. Несмотря на то, что для ряда генов описаны лишь варианты с вероятно патогенной и с неопределенной значимостью, они не могут быть исключены из рассмотрения при ГКМП и заслуживают более пристального исследования. Постоянно описываются не только новые варианты, но и новые гены, патогенные варианты которых могут приводить к развитию ГКМП. Так, показано, что варианты в генах *ACTN2*, *ALPK3*, *CSRP3*, *FHOD3*, *FLNC*, *JPH2*, *KLHL24*, *PLN* и *TRIM63*, кодирующих несаркомерные белки с различными функциями, могут приводить к ГКМП [Walsh R. et al., 2022]. Среди 387 неродственных пациентов с ГКМП доля лиц с патогенными/вероятно патогенными вариантами пяти основных генов (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) составила 33,3%, а при скрининге 20 других минорных кандидатных генов выявлены вероятно патогенные варианты в генах *ACTC1*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *GLA* и *PRKAG2* у 12 пациентов; у 1,3% пациентов были обнаружены патогенные вариации числа копий участков ДНК (CNV): 2 делеции в гене *MYBPC3* и 2 делеции, затрагивающие полную кодирующую область *PLN* [Mademont-Soler I. et al., 2017]. В другой работе при исследовании гетерогенной выборки пациентов с подозрением на клинический диагноз ГКМП (1376 образцов), диагностированы 373 патогенных либо вероятно патогенных вариантов, 85,0% из которых были локализованы в генах, кодирующих саркомер, 4,3% в генах РАСопатий, а 2%

локализованы в генах, связанных с кардиомиопатией, отличной от ГКМП, или с наследственной аритмией [Hathaway J., Heliö K. et al., 2021]. Различия по частоте выявления патогенных вариантов в генах ГКМП могут зависеть от критериев, которые использовались при формировании групп для исследования [Ingles J. et al., 2019]. В восьми основных генах, кодирующих саркомерные белки (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*) обнаруживается более 90% патогенных вариантов у пациентов с ГКМП [Walsh R. et al., 2022].

1.2.1 Гены саркомерных белков и их продукты

Мутации в генах, кодирующих миозин связывающий белок С (*MYBPC3*) и тяжелую цепь β -миозина (*MYH7*), обнаруживают у 70-75% вариант-позитивных пациентов, а на другие гены (*TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3* и *ACTC1*) приходится по 1-5% случаев [Pora-Fotea N.M. et al., 2019; Ommen S.R. et al., 2020; Hathaway J. et al., 2021]. Классически, принято считать, что подавляющее большинство патогенных вариантов определяются в перечисленных генах, которые принято называть «коровыми генами» (Таблица 5) [Pora-Fotea N.M. et al., 2019; Mazzarotto F. et al., 2020].

Таблица 5. Характеристика основных генов саркомерных белков, мутации в которых приводят к развитию гипертрофической кардиомиопатии

Ген (локализация)	Размер гена (п.о.), число экзонов	Кодируемый белок	Число вариантов
			Патогенных/вероятно патогенных/с неопределенной значимостью
<i>MYBPC3</i> (11p11.2)	4217, 35	Миозин связывающий белок С	298/160/750
<i>MYH7</i> (14q11.2)	6027, 40	Тяжелая цепь β миозина	55/128/1121
<i>TNNT2</i> (1q32.1)	1362, 17	Тропонин Т2, сердечный тип	11/20/190
<i>TNNI3</i> (19q13.42)	843, 8	Тропонин I3, сердечный тип	13/19/171
<i>TPM1</i> (15q22.2)	2950, 14	α -тропомиозин	3/10/162

Примечание. Составлено по [Pérez-Palma E. et al., 2019].

1.2.2 Структура саркомера

Саркомер – функциональная единица поперечнополосатой и сердечной мышечной ткани, состоящая из сложного сплетения толстых филаментов, тонких филаментов и гигантского белка титина (Рисунок 1) [Saini H. et al., 2014].

Латеральными границами саркомера являются Z-диски. С каждой стороны диска располагаются I-полосы (I-band), в которых отсутствуют толстые миозиновые нити. А-полоса (A-band) включает область, простирающуюся на всю протяженность толстых нитей. М-полоса расположена по центру А-полосы. Сила мышечного сокращения возникает в результате прикрепления моторного белка миозина к нитям актина, тянущего Z-диск в направлении М-полосы (M-line) [Henderson C.A. et al., 2017].

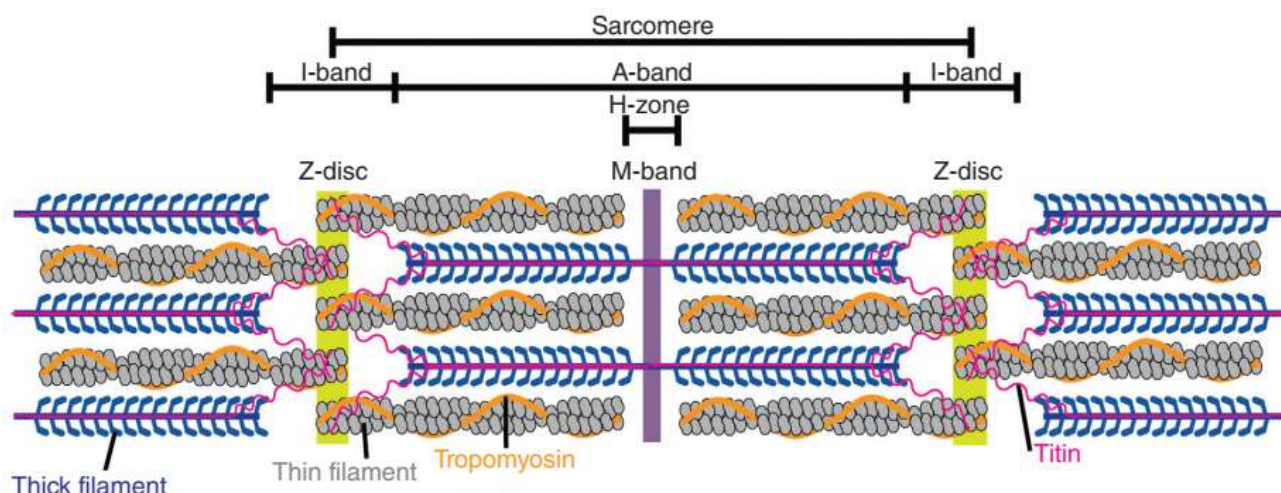


Рисунок 1. Схема саркомера сердца, изображающая три основные филаментные системы (нити): актиновые тонкие (обозначены серым цветом), миозиновые толстые (синий) и титиновые нити (розовый). Внешними границами саркомера являются Z-диски. I-полосы - область, окружающая Z-диски, состоящая только из тонких актиновых нитей. А-полоса включает в себя тонкие и толстые нити. М-полоса входит в H-область, в которой толстые нити не пересекаются с другими толстыми нитями [Henderson C.A., Gregorio C.C., 2015].

1.2.3 Гены *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*

Ген ***MYBPC3*** (ENSG00000134571) расположен в локусе 11p11.2, состоит из 35 экзонов и кодирует сердечную изоформу миозин связывающего белка (сMyBP-C, ENSP00000442795.1, Таблица 5). В базе данных Simple ClinVar описано 458 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в данном гене,

ассоциированных с ГКМП. Среди них чаще всего встречаются варианты со сдвигом рамки считывания – 191 (43,9%), нонсенс-варианты – 105 (24,1%), варианты с изменением сайтов сплайсинга – 82 (18,9%), интронные варианты – 32 (7,4%) и миссенс-варианты – 25 (5,7%) [Pérez-Palma E. et al., 2019; <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>]. Предполагаемый механизм, приводящий к формированию заболевания – гаплонедостаточность сMyBP-C [Henderson C.A. et al., 2017; Glazier A.A. et al., 2019].

Белок, кодируемый геном *MYBPC3*, является одним из компонентов толстой нити саркомера и располагается в области А-диска. Он взаимодействует с толстыми и тонкими нитями, а также с титином (Рисунок 2).

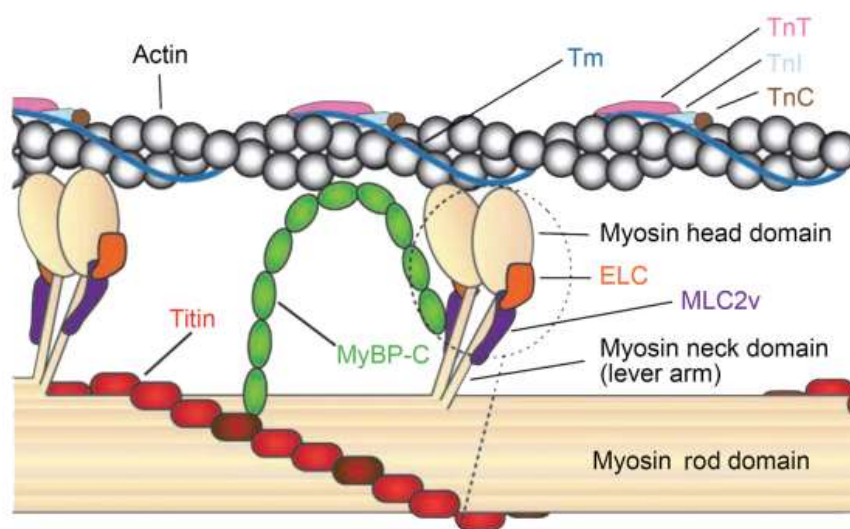


Рисунок 2. Основные регуляторные белки миозина. Миозин связывающий белок С (MyBP-C), основная легкая цепь миозина (ELC) и регуляторная легкая цепь миозина 2 (MLC2v) являются регуляторными белками толстой нити саркомера и контролируют мышечное сокращение. Показаны взаимодействия «хвостового» домена миозина, MLC2v и титина. Обозначения: Tm, тропомиозин; TnT, тропонин Т; TnI, тропонин I; TnC, тропонин С [Sheikh F. et al., 2014].

Сердечная изоформа белка тканеспецифична и ген *MYBPC3* экспрессируется только в миокарде [GTEx]. сMyBP-C состоит из нескольких повторяющихся иммуноглобулиноподобных и фибронектиновых III типа доменов и является крупнейшим в семействе миозин-связывающих белков (Рисунок 3).

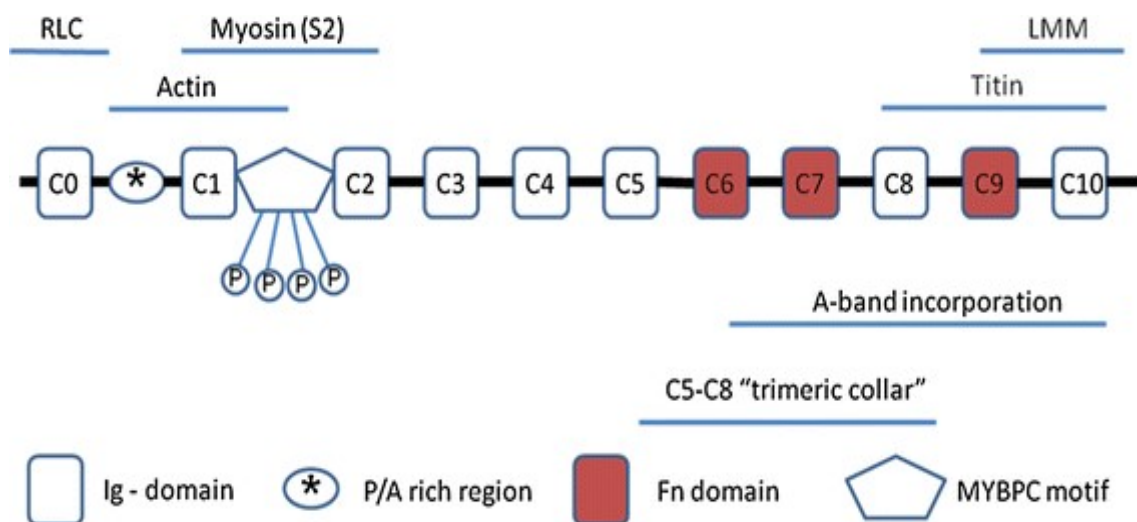


Рисунок 3. Структура миозин-связывающего белка. Отмечены важные структурные домены. Указаны регионы взаимодействия с другими белками. Ig – иммуноглобулин; P/A – пролин/аланин; Fn – фибронектин [Knöll R, 2012].

Домен C10 является высококонсервативным и позволяет взаимодействовать с миозином, обеспечивая стабильность толстых нитей [Kampourakis T. et al., 2014]. С-конец белка связывает титин и необходим для правильного расположения в А-диске [Gilbert R. et al., 1999]. N-конец связан с нитями актина и, вероятно, участвует в управлении процессами мышечного сокращения путем изменения активности актин-активированной миозиновой АТФазы [Luther P.K., Craig R., 2011]. При фосфорилировании сMyBP-C изменяется взаимодействие с S-регионом миозина, что влияет на процессы сокращения сердца [Sadayappan S. et al., 2006]. Кроме того, предполагается, что взаимодействие с титином позволяет сMyBP-C работать слаженно со всеми филаментными системами и влиять на процессы генерации и передачи силы сокращения, а также на сенсорные и сигнальные процессы [van Dijk S.J. et al., 2014]. Участие сMyBP-C в трех филаментных системах объясняет ключевую роль патогенных генетических вариантов в гене *MYBPC3* в обеспечении функционирования сердечной мышцы – примерно у 20-50% пациентов с ГКМП обнаруживаются мутации в этом гене [Henderson C.A. et al., 2017; Glazier A.A. et al., 2019; Hathaway J. et al., 2021].

Ген ***MYH7*** (ENSG00000092054) расположен на длинном плече 14 хромосомы (14q11.2), состоит из 40 экзонов и кодирует тяжелую цепь β миозина (MHC- β , ENSP00000347507.3, Таблица 5). В базе данных Simple ClinVar описано

183 патогенных и вероятно патогенных генетических варианта, локализованных в данном гене, ассоциированных с ГКМП. Подавляющее большинство из них: миссенс-варианты – 167 (97,09%), варианты в сайтах сплайсинга – 4 (2,32%), со сдвигом рамки считывания – 1 (0,58%) [Pérez -Palma E. et al., 2019; <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>]. Мутации в гене *MYH7* обычно приводят к формированию белковых агрегатов и их накоплению под сарколеммой, дегенерации мышечных волокон, и/или ослаблению моторной функции миозина [Henderson C.A. et al., 2017].

МНС- β является основным компонентом толстой нити и, взаимодействуя с тонкими нитями, играет роль молекулярного двигателя мышечного сокращения. Каждая молекула белка состоит из одной или двух молекул тяжелых цепей и нескольких молекул легких цепей. В белке выделяют три области: головной N-конец, «шею» и С-концевой хвост (Рисунок 4). Консервативный головной регион содержит моторный домен, связывающийся с нитями актина и обеспечивающий мышечное сокращение посредством гидролиза АТФ. Шейный регион выполняет роль рычага и передает силу на высоко полиморфный хвостовой регион (Рисунок 2). Легкие цепи миозина, связывая шейный регион, регулируют моторную функцию [Henderson C.A. et al., 2017]. Тяжелые и легкие цепи скручиваются в макромолекулярный комплекс, обеспечивающий движение в клетке.

Мышечный миозин – это гетеро-мультимер, состоящий из двух тяжелых цепей миозина (МНС- β) и двух пар неидентичных легких цепей миозина (MLC) [Ruppel K.M., Spudich J.A., 1996]. Область N-конца МНС- β взаимодействует с двумя MLC, образуя голову миозина, которая связывает нити актина. С-концы двух молекул МНС- β взаимодействуют, образуя спиральную катушку двойной спирали, из чего формируется удлиненный хвост [Sellers J.R., 2000]. Хвосты нескольких молекул миозина, объединяясь, формируют основу толстой нити. Мышечное сокращение инициируется присоединением к F-актину головы миозина и происходит за счет ее АТФазной активности [Rayment I. et al., 1993]. Гидролиз АТФ приводит к конформационным изменениям в молекуле миозина, которые называются «рабочий ход». Эффект рабочего хода миозина заключается

в смещении тонких нитей в направлении середины саркомера, что выражается в его сокращении [Sweeney H.L., Houdusse A., 2010]. Далее АДФ диссоциирует, а молекула миозина возвращается в расслабленное состояние [Huxley H., 1985].

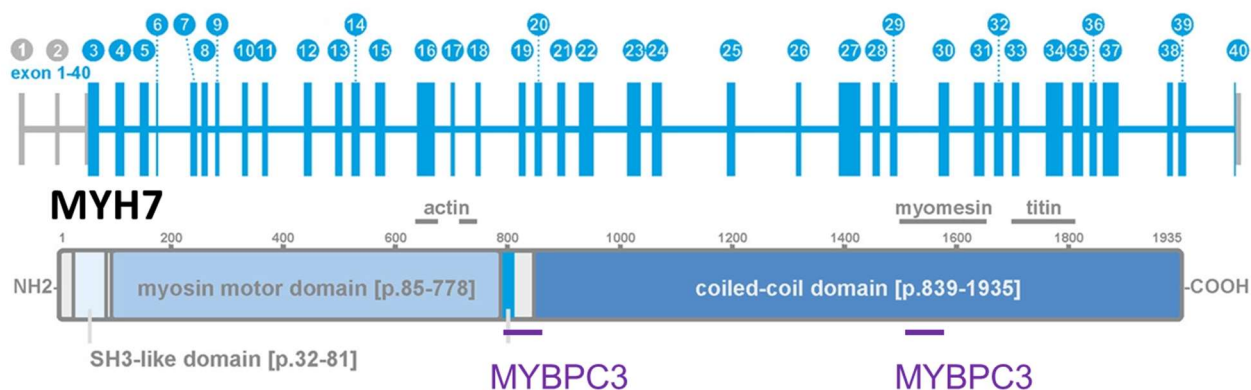


Рисунок 4. Структура гена и белковой последовательности тяжелой цепи β миозина. Выделяют головной N-конец (до середины 22 экзона), «шею» (середина 22 по 29 экзон) и С-концевой хвост (от 30 экзона). Указаны регионы взаимодействия с другими белками [Kolokotronis K. et al., 2019].

Различные изоформы тяжелых и легких цепей миозина обладают различными энергетическими характеристиками, соответствующими различным мышечным группам и периодам онтогенеза. В то время как α -изоформа тяжелой цепи миозина, которая кодируется другим (соседним) геном *MYH6*, экспрессируется у детей, а β -изоформа тяжелой цепи миозина преобладает в сердце взрослого человека [Henderson C.A. et al., 2017].

Тропонин – это регуляторный комплекс, состоящий из трех субъединиц: тропонина С (TnC), тропонина I (TnI) и тропонина Т (TnT). Ген *TNNC1* (ENSG00000114854) расположен на коротком плече 3 хромосомы (3p21.1), состоит из 6 экзонов и кодирует сердечную изоформу тропонина C1 (ENSP00000232975.3). Ген *TNNT2* (ENSG00000118194) расположен на длинном плече 1 хромосомы (1q32.1), состоит из 17 экзонов и кодирует сердечную изоформу тропонина T2 (ENSP00000499593.1, Таблица 5). Ген *TNNI3* (ENSG00000129991) расположен на длинном плече 19 хромосомы (19q13.42),

состоит из 8 экзонов и кодирует сердечную изоформу тропонина I3 (ENSP00000341838.5, Таблица 5).

Во всех субъединицах тропонинового комплекса описаны сотни мутаций, локализованных в разных регионах белка при ГКМП, дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) и рестриктивной кардиомиопатии (РКМП) различной степени тяжести [Henderson C.A. et al., 2017]. В базе данных Simple ClinVar в гене *TNNC1* описано 5 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с ГКМП, все они являются миссенс-вариантами. В гене *TNNT2* описан 31 патогенный и вероятно патогенный генетический вариант, ассоциированный с ГКМП, среди них миссенс-вариантов - 22, коротких инсерций и делеций без сдвига рамки считывания – 4, вариантов в сайтах сплайсинга – 3, нонсенс-вариантов – 2. В гене *TNNI3* описаны 32 патогенных и вероятно патогенных генетических варианта, ассоциированных с ГКМП, среди них 29 миссенс-вариантов, 2 короткие инсерции и делеции без сдвига рамки считывания, 1 вариант в сайте сплайсинга [Pérez-Palma E. et al., 2019; <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>].

Тропониновый комплекс взаимодействует с актиновыми тонкими нитями и тропомиозином и регулирует формирование актомиозинового комплекса (Рисунок 2). ТnC представлен тремя изоформами (быстрая скелетная, медленная скелетная и сердечная) и состоит по большей части из кальций-связывающих мотивов (Рисунок 5А). Связывание кальция приводит к конформационным изменениям, которые позволяют N-концевому домену взаимодействовать с ТnI.

Тропонин I является ингибирующей субъединицей тропонинового комплекса, обладающей способностью блокировать АТФазную активность актомиозина в присутствии других тропонинов и тропомиозина. ТnC, взаимодействуя с ТnI, теряет связь с актином, смещает тропомиозин и позволяет миозину образовать слабую связь с актином. Существующие изоформы тропонина I - медленная скелетная, быстрая скелетная и сердечная - кодируются тремя разными генами: *TNNI1*, *TNNI2* и *TNNI3* соответственно. Структурно ТnI состоит из региона «IT-arm», ингибиторного домена, регуляторного домена,

подвижного С-концевого домена, а сердечная изоформа содержит специфический N-концевой домен (Рисунок 5В).

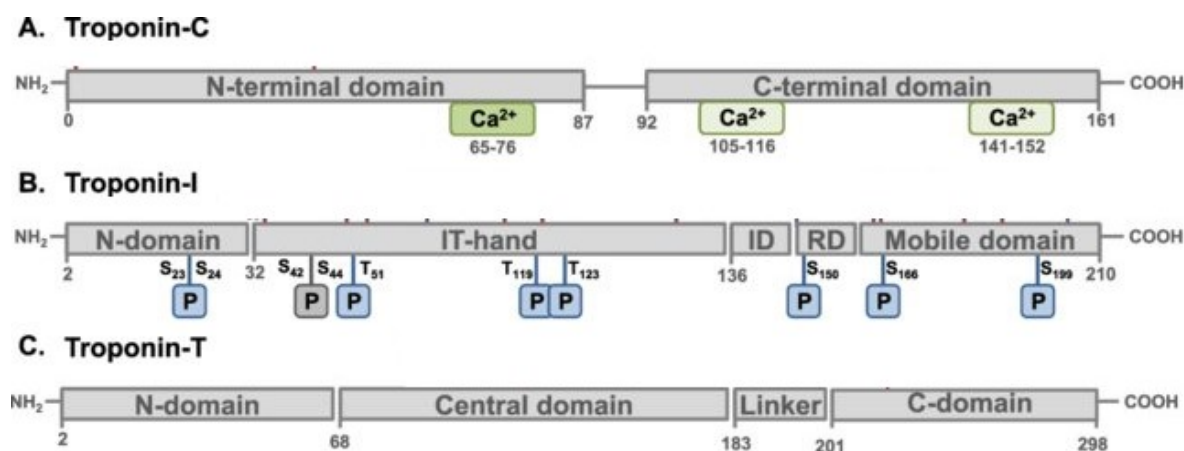


Рисунок 5. Структура доменов белков тропонинового комплекса. А) Структура доменов сердечной изоформы тропонина С. Сайты связывания ионов кальция обозначены зеленым: темно-зеленым сайт с высокой аффинностью, светло-зеленым с низкой аффинностью. В) Структура доменов сердечной изоформы тропонина I. ID – ингибиторный домен; RD – регуляторный домен; P – сайты фосфорилирования. С) Структура доменов сердечной изоформы тропонина Т [Janssens J.V. et al., 2018].

Тропонин Т играет роль якоря, прикрепляющего тропониновый комплекс к тропомиозину. Тропонин Т также представлен медленной скелетной (кодируется геном *TNNT1*), сердечной (*TNNT2*) и быстрой скелетной (*TNNT3*) изоформами и состоит из региона «IT-arm», ингибиторного домена, региона-«переключателя», подвижного С-концевого домена (Рисунок 5С). ТnТ выполняет структурную функцию, объединяя субъединицы тропонинового комплекса и прикрепляя ТnС и ТnI к тонким нитям. Кроме того, показана его роль в мышечном сокращении за счет регуляции активности актомиозиновой АТФазы, чувствительности к кальцию, а также в процессе сокращения саркомера [Henderson C.A. et al., 2017]. Характерный для ТnI и ТnТ «IT-arm» регион участвует в образовании спиральной катушки из белковых последовательностей обоих белков, которые, вместе с С-концевой областью ТnС формируют опору для N-конца ТnС и актин-связывающего региона ТnI [Sevrieva I. et al., 2014].

Ген ***TPM1*** (ENSG00000140416) расположен на длинном плече 15 хромосомы (15q22.2), состоит из 14 экзонов и кодирует белок α -тропомиозин (ENSP00000385107.4, Таблица 5). В базе данных Simple ClinVar в гене *TPM1* описаны 13 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов, ассоциированных с ГКМП. Среди них большинство миссенс-варианты (12), короткие инсерции и делеции без сдвига рамки считывания (1) [Pérez-Palma E. et al., 2019; <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/>].

Ключевая роль тропомиозина в координированной активации тонких нитей и сократительной функции объясняет, почему мутации в гене тропомиозина могут приводить к тяжелым последствиям для функции мышц. Для множества мутаций в *TPM1* показана связь с ГКМП и ДКМП. Мутации обнаруживаются в различных участках гена и проявляются симптомами различной степени тяжести. Интересно, что мутации в одной части тропомиозина могут влиять на расстоянии на другую часть белка [Henderson C.A. et al., 2017]. Например, было показано, что мутация p.Asp137Leu изменяет гибкость тропомиозина и данное изменение распространяется на всю протяженность белка [Yar S. et al., 2013].

Тропомиозин, вместе с актином, участвует в правильном функционировании саркомера, выполняя структурную и регуляторную функции (Рисунки 2, 6).

Две α -спиральные цепи формируют спиральную катушку, которая взаимодействует с позитивно заряженными участками нитей актина [von der Ecken J. et al., 2015] и образует димеры, охватывающие семь мономеров актина [Hitchcock-DeGregori S.E., 2008]. Эти димеры ориентированы голова-к-хвосту и охватывают тонкие нити. Это увеличивает жесткость нитей актина и предотвращает деполимеризацию тонких нитей [Wegner A., 1982]. Схожим образом, связывание актина и тропомиозина снижает подвижность последнего, еще более стабилизируя связь актина и тропомиозина [Rayes R.F. et al., 2011].

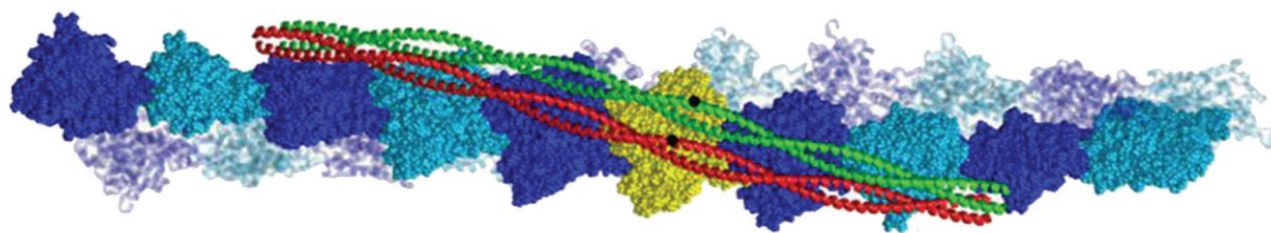


Рисунок 6. Расположение димера из двух молекул тропомиозина на поверхности актина. Тропомиозин регулирует взаимодействие тонких нитей и толстых нитей, управляя образованием связей между молекулами актина и миозина. Зеленым изображено положение тропомиозина в присутствии «головного» домена миозина, красным при его отсутствии [Orzechowski M. et al., 2014].

Тропомиозин, вместе с тропонинами формирует комплекс, регулирующий взаимодействие тонких актиновых и толстых миозиновых нитей [Craig R., Lehman W., 2001]. В условиях низкой концентрации кальция тропомиозин закрывает внешние домены актина и блокирует миозин-связывающие сайты. При повышении концентрации кальция TnC связывается с ним, что приводит к отсоединению TnI, конформационным сдвигам в тропомиозине и, как следствие, открывает миозин-связывающие сайты актина [Lehman W. et al., 2000].

1.3 Современные молекулярно-генетические подходы к изучению генетической основы гипертрофической кардиомиопатии

Молекулярно-генетическими методами, использовавшимися ранее для поиска генетических вариантов у пациентов с ГКМП, являются денатурирующая жидкостная хроматография высокого разрешения (DHPLC), анализ полиморфизма конформации одноцепочечного ПЦР фрагмента (SSCP), а также анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) [Arad M. et al., 2002]. Для обнаружения локуса, связанного с заболеванием в семье с обширной родословной, может использоваться сегрегационный анализ, определяющий связь между известным генетическим локусом (установленной ДНК-пробой) и геном, ответственным за исследуемое заболевание. Например, в ставшей классической работе, впервые установившей локус ГКМП, не был известен кандидатный ген,

вследствие чего был проведен полногеномный скрининг с помощью 41 реакции ПДРФ, покрывающих весь геном. Это позволило в обследуемой семье установить связь с ГКМП для локуса на длинном плече 14-й хромосомы [Jarcho J.A. et al., 1989].

Последующие работы позволили идентифицировать ген, а, в дальнейшем, методом блоттинга по Саузерну был выявлен миссенс вариант p.Arg403Glu в гене *MYH7* [Jarcho J.A. et al., 1989]. Впоследствии было открыто множество других патогенных вариантов в генах саркомерных и несаркомерных белков, связанных с ГКМП [Moody W.E., Elliott P.M., 2022].

Развитие современных молекулярно-генетических методов и, в частности, методов секвенирования нового поколения, привело к значительному прогрессу в генодиагностике наследственных заболеваний. Технология массового параллельного секвенирования ДНК (секвенирование второго поколения) обеспечила возможность создания диагностических панелей, включающих десятки генов моногенных заболеваний, в том числе и ГКМП. Однако, у 40-70% пациентов, страдающих ГКМП, по-прежнему не удастся поставить молекулярно-генетический диагноз [Maron B.J., Maron M.S., 2013; Walsh R. et al., 2017; Ommen S.R. et al., 2020; Габрусенко С.А. и др., 2020; Hathaway J. et al., 2021; Muresan I.D., Agoston-Coldea L., 2021].

Отчасти, высокий процент пациентов с неустановленной генетической причиной ГКМП может объясняться тем, что ген с мутацией, ведущей к формированию заболевания, не вошел в диагностическую панель. При этом расширение генетических панелей за счет дополнительного включения кандидатных генов оказывает незначительный эффект на диагностический эффект, увеличивая при этом число неоднозначных и трудных для интерпретации генетических вариантов [Gomes A.C. et al., 2020]. С другой стороны, в диагностические панели включают, в основном, только белок-кодирующие регионы генов (экзоны) [Wood K.A., Ellingford J.M. et al., 2021]. Исследовать некодирующие (интронные) регионы возможно с помощью полногеномного секвенирования (WGS). Например, использование данного подхода позволило

выявить патогенные и вероятно патогенные генетические варианты у 20% семей, у которых не удалось установить молекулярно-генетическую причину ГКМП таргетными методами секвенирования с применением панели, включавшей 46 генов. У 9% семей были обнаружены глубокие интронные варианты в гене *MYBPC3* [Bagnall R.D. et al., 2018].

Появление технологий секвенирования третьего поколения (мономолекулярное секвенирование) позволяет оценивать изменчивость протяженных участков генов за счет длинных прочтений. К числу таких технологий относится метод нанопорового секвенирования, который позволяет определять последовательность нуклеотидов по профилю изменения силы электрического тока через нанопору по мере прохождения через нее молекулы ДНК [Deamer D. et al., 2016].

За счет длинных прочтений появляется возможность изучать варианты в интронах, а также оценивать структуру гаплотипов в изучаемых генах непосредственно, а не с использованием статистических подходов. Например, в родословной с двумя мутациями *MYH7* (p.Val606Met и p.Ala728Val) в цис-положении было показано, что эта комбинация мутаций характеризуется более тяжелым течением кардиомиопатии и высокой вероятностью внезапной смерти (3 из 8 выявленных носителей мутаций), тогда как мутация p.Val606Met сама по себе не связана с высоким риском внезапной смерти [Blair E. et al., 2001].

В настоящее время точность единичных прочтений для нанопорового секвенирования колеблется в пределах 93–98%, что вносит “шум” в получаемые первичные данные, но поскольку ошибки носят случайный характер, большая их часть может быть отсеяна на этапе биоинформатической обработки исходных сигналов. При этом данная технология продолжает развиваться за счет постоянного совершенствования как реагентов, так и алгоритмов обработки данных. Кроме того, преимуществом технологии нанопорового секвенирования является то, что в ходе выполнения секвенирования у исследователя есть возможность остановить эксперимент в любой момент времени, если объем полученных данных достаточен для анализа [Payne A. et al., 2021].

В последнее время технологии мономолекулярного секвенирования находят применение в диагностике наследственных заболеваний: для поиска структурных вариаций, tandemных повторов, анализа эпигенетических вариаций и изоформ РНК [Ameur A. et al., 2019]. Так, в одной из работ выполнено транскриптомное секвенирование образца миокарда у пациента с ГКМП с вариантом, приводящим к пропуску 20-го экзона в гене *MYBPC3* за счет появления сайта альтернативного сплайсинга, и, как следствие, к появлению укороченной формы белка. Такое состояние приводит к развитию гаплонедостаточности продукта гена, что может способствовать развитию заболевания [Dainis A. et al., 2019].

Наличие у пациента двух патогенных вариантов, в том числе в разных генах, обычно является неблагоприятным и обуславливает особенно тяжелое течение ГКМП. В недавнем мета-анализе было показано, что манифестация заболевания у пациентов старше 21 года с несколькими генетическими вариантами наступает в среднем на 7 лет раньше, чем у пациентов с единственным генетическим вариантом [Christian S. et al., 2022]. Также считается, что наличие двух мутаций в генах белков саркомера связано с повышенным риском внезапной смерти [Maron B.J., Maron M.S., 2013]. Описан семейный случай ГКМП, с тяжелым течением заболевания у двух детей и мягкой картиной у матери. У всех троих были найдены два патогенных варианта в генах *TTN* и *ALPK3*. У сибсов также был обнаружен патогенный вариант p.Ala13Thr в гене *MYL2*. Авторы заключают, что этот случай ГКМП является «олигогенным» и обусловлен несколькими патогенными генетическими вариантами [Li L. et al., 2017].

Недавно был описан случай с сочетанием мутаций в генах *MYBPC3* и *MYH7* у пациента с тяжелым фенотипом и ранним началом заболевания [Дземешкевич С.Л. и др., 2018]. Вместе с тем, число исследований, в которых предпринимаются попытки выявить фенотипический эффект не отдельных мутаций, а их комбинаций, в том числе комбинаций с распространенными полиморфизмами, невелико. Можно отметить работу отечественных исследователей, в которой были выявлены варианты и их комбинации, связанные с риском кардиомиопатии,

а также варианты в *TNNT2* с протективным эффектом [Glotov A.S. et al., 2015]. Показана ассоциация полиморфизма rs2250509 в гене миозин связывающего белка H (*MYBPH*) с параметрами гипертрофии миокарда в родословной с гипертрофической кардиомиопатией, вызванной мутацией p.Ala797Thr в гене *MYH7* [Mouton J.M. et al., 2016].

Известно, что до 10% мутаций при наследственных заболеваниях – это варианты, нарушающие сайты сплайсинга [Salman O.F. et al., 2018; Li Q. et al., 2021]. Однако, помимо канонических сайтов сплайсинга, мутации в интронах могут затрагивать сайты связывания факторов транскрипции, CpG-сайты (эпигенетическая регуляция активности генов), активировать криптические сайты сплайсинга, приводящие ко включению фрагмента интрона в мРНК при транскрипции. Например, у пациента с тяжелой формой ГКМП, также при помощи WGS была обнаружена интронная гомозиготная мутация (с.113-10C>G) в гене *NDUFB7*. Активация криптического сайта сплайсинга была подтверждена секвенированием РНК и функциональным исследованием фибробластов пациентов [Correia S.P. et al., 2021].

В другом исследовании у членов португальской семьи с ГКМП с помощью WGS был обнаружен гетерозиготный генетический вариант (с.1227-13G>A) в 14м интроне гена *MYBPC3*. Найденный вариант классифицирован как вероятно патогенный и был обнаружен у четырех родственников с ГКМП и отсутствовал у здоровых членов семьи [Gomes A.C. et al., 2020]. Также описан интронный вариант IVS4+919G>A в гене *GLA*, ассоциированный с тяжелой кардиомиопатией и аритмией [Juang J.J. et al., 2019].

Однако интронная изменчивость генов ГКМП и ее возможная функциональная значимость являются нечастым предметом исследования. В недавнем мета-анализе молекулярно-генетической диагностики при ГКМП из 132 включенных работ лишь две оценивают эффективность полногеномного секвенирования [Christian S. et al., 2022].

С другой стороны, вариабельность в интронах генов саркомерных белков, а именно *MYBPC3* (rs2269434) и *TNNT2* (rs10920184), показала связь с QRS-

комплексом и массой миокарда левого желудочка индивидов в полногеномном исследовании ассоциаций [van der Harst P. et al., 2016]. В другой работе, интронный вариант rs1892027 гена *TNNT2* был связан с морфологией трабекул миокарда и его функцией [Meyer H.V. et al., 2020]. Не исключено, что генетические варианты могут быть не только ключевыми факторами для инициации заболевания (мутации в генах саркомерных белков при ГКМП), но и, вероятно, служат дополнительным фактором-модификатором фенотипа при уже развившемся заболевании (формирование гипертрофии миокарда при артериальной гипертензии, как многофакторного заболевания).

1.4 Заключение

ГКМП – одно из наиболее частых наследственных заболеваний, которое обусловлено, главным образом, мутациями в генах белков, образующих саркомер кардиомиоцитов. Несмотря на многолетние активные исследования, до сих пор не удается идентифицировать мутации у всех пациентов, а также прогнозировать тяжесть заболевания на основании генетических данных. Кроме того, одной из серьезных проблем является надежность оценки патогенности генетических вариантов, выявляемых в процессе генодиагностики. Существует риск обозначения редкого полиморфизма как патогенной мутации и наоборот.

Одновременно, интенсивно накапливается объем экзомных и полногеномных данных, при анализе которых все большая роль отводится статистическим и биоинформатическим подходам. Интронная же изменчивость генов ГКМП и ее возможная функциональная значимость являются нечастым предметом исследования. При этом мутации в интронах могут затрагивать сайты сплайсинга, сайты связывания факторов транскрипции и гены некодирующих РНК.

Данные литературы свидетельствуют о том, что изменчивость как в экзонах, так и в интронах генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TRPM1*) может вносить вклад в формирование ГКМП. Однако существенно меньше

известно о модифицирующем эффекте их генетической variability в отношении гипертрофии миокарда при артериальной гипертензии.

Современная молекулярно-генетическая диагностика ГКМП основывается на методах массового параллельного секвенирования. В зависимости от объема проводимого исследования (количество генов в генетической панели, включение интронных областей в исследование) результативность данного подхода варьирует от 40 до 70%.

Технология мономолекулярного секвенирования продуктов длинных фрагментов ПЦР, в частности нанопоровое секвенирование, также позволяет оценивать однонуклеотидную изменчивость, но кроме того в случаях обнаружения нескольких генетических вариантов, напрямую определять гаплотип, а включение в анализ интронных последовательностей генов позволяет осуществлять поиск вариантов, способных влиять на процесс сплайсинга. Однако данная технология не использовалась для анализа variability полной последовательности генов саркомерных белков при гипертрофии миокарда различного генеза. Не исключено, что такой подход позволит увеличить долю генетически объясненных случаев среди пациентов с ГКМП. Кроме того, будут получены данные о полиморфизме исследуемых генов, которые могут быть использованы в дальнейшем для исследований, направленных на выявление дополнительных генетических факторов, влияющих на тяжесть течения гипертрофии миокарда.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1. Дизайн исследования

Исследование выполнено на базе Центра коллективного пользования научно-исследовательским оборудованием и экспериментальным биологическим материалом «Медицинская геномика» НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетами по биомедицинской этике НИИ кардиологии Томского НИМЦ (протокол №151 от 22.12.2016 г.) и НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (протокол №4 от 25.11.2019 г.). От всех пациентов получено добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и дальнейшее использование полученных данных в научных целях.

В работу были включены пациенты с гипертрофией миокарда. Диагноз устанавливался по данным клинического, параклинического и инструментального обследования. Индивиды включались в группу ГКМП или в выборку гипертрофия миокарда при артериальной гипертензии (Рисунок 7). У всех пациентов брались образцы периферической венозной крови, из которых выделялась ДНК. Полученная ДНК использовалась для приготовления ДНК-библиотек и анализа нуклеотидной изменчивости полной последовательности генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* с помощью массового параллельного секвенирования или мономолекулярного нанопорового секвенирования. Отдельные идентифицированные генетические варианты подтверждались с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Биоинформатическая и статистическая обработка данных осуществлялась с помощью различных инструментов с целью идентификации потенциально значимых генотипов и анализом их ассоциации с фенотипом гипертрофии миокарда различного генеза.

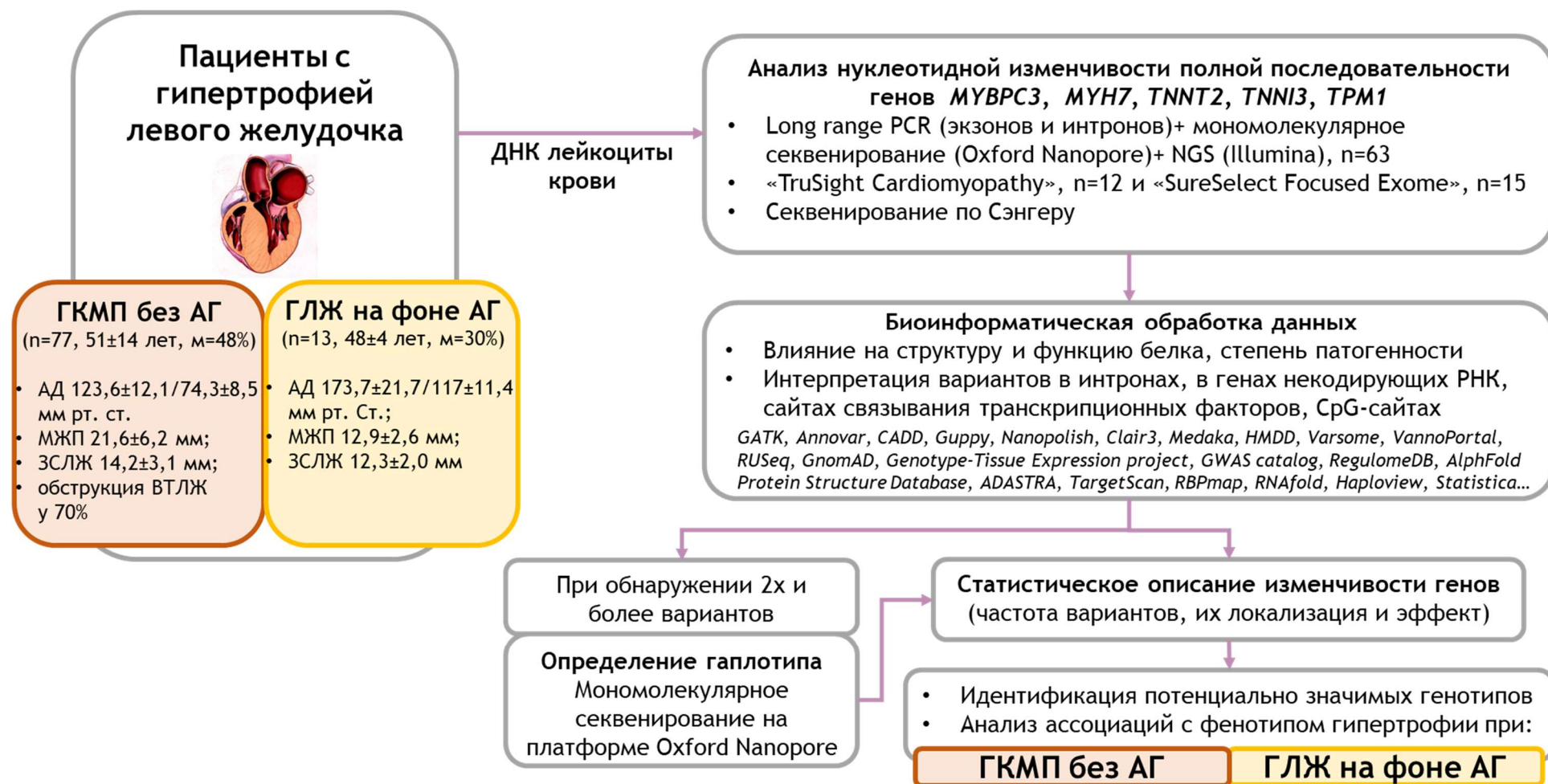


Рисунок 7. Дизайн исследования. Примечание: ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, АГ – артериальная гипертензия, ГЛЖ – гипертрофия левого желудочка, АД – артериальное давление, МЖП – межжелудочковая перегородка, ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка, ВТЛЖ – выходной тракт левого желудочка.

Выборки пациентов с гипертрофией миокарда различного генеза сформированы на базе НИИ кардиологии Томского НИМЦ (отделение атеросклероза и хронической ишемической болезни сердца, заведующий – д.м.н., профессор Павлюкова Е.Н.) и с использованием ресурсов биологической коллекции «Биобанк населения Северной Евразии». Массовое параллельное секвенирование и подготовка ДНК-библиотек с помощью TruSight Cardiomyopathy Sequencing Panel (Illumina, США) для 12 пациентов с ГКМП проводилось в сотрудничестве с коллегами из Санкт-Петербурга (СПБ ГБУЗ Городская Больница №40 - руководитель сектора клинико-генетических исследований, д.м.н., О.С. Глотов), а набора SureSelect Focused Exome (Agilent, США) для 15 пациентов с ГКМП – с лабораторией эпигенетики развития ФИЦ ИЦиГ СО РАН (заведующий – д.б.н, профессор Закиян С.М.). Анализ цис-/транс- положения нескольких клинически значимых вариантов в гене *MYH7* выполнен с использованием образца ДНК пациента с ГКМП, полученном из лаборатории медицинской генетики ГНЦ РФ ФГБНУ “РНЦХ имени академика Б.В. Петровского” (руководитель лаборатории – д.м.н. Заклязьминская Е.В.).

2.2 Характеристика выборок пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Критериями для включения в группу ГКМП были возраст старше 18 лет и установленный клинический диагноз в соответствии с клиническими рекомендациям Европейского общества кардиологов [Elliott P.M. et al., 2014]. Диагноз основан на результатах эхокардиографического исследования (ЭхоКГ): гипертрофия левого желудочка (ГЛЖ) ≥ 15 мм в одном или более сегментах; отношение толщины межжелудочковой перегородки (МЖП) к задней стенке левого желудочка (ЗСЛЖ) 1,3 и более; наличие обструкции в выходном тракте левого желудочка (ВТЛЖ) - в случае определения градиента давления ≥ 50 мм рт. ст.; для дифференциальной диагностики, обнаруживаемые изменения не должны объясняться иными заболеваниями сердечно-сосудистой системы таких как

артериальная гипертензия (как правило приводящая к симметричной гипертрофии миокарда без обструкции ВТЛЖ) или выраженной патологии клапанного аппарата.

Всего в группе пациентов с ГКМП было 77 человек (средний возраст 51 ± 14 лет, мужчин - 48%). Толщина МЖП в среднем $21,6 \pm 6,2$ мм; толщина ЗСЛЖ в среднем $14,2 \pm 3,1$ мм; обструкция ВТЛЖ выявлена у 70%; хирургическая коррекция по поводу обструкции ВТЛЖ была у 32% пациентов. Систолическое/диастолическое АД в среднем составило $123,6 \pm 12,1 / 74,3 \pm 8,5$ мм рт. ст. У 58,3% пациентов с ГКМП наблюдался III функциональный класс сердечной недостаточности, согласно классификации Нью-Йоркской Ассоциации сердца (NYHA). По данным коронарной ангиографии, все пациенты с ГКМП имели ангиографически неизмененные коронарные артерии.

В молекулярно-генетическое исследование также вошел образец ДНК пробанда (женщина) с ГКМП, семейная форма, без обструкции ВТЛЖ, который был носителем в гетерозиготном состоянии нескольких генетических вариантов в гене *MYH7*: VUS c.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и VUS c.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys). Признаки сердечной недостаточности резко проявились в возрасте 30 лет после перенесенной пневмонии и после смерти брата, хотя о шумах в сердце педиатр сообщал с детства. У пациента выявлены нарушения ритма сердца: атриовентрикулярная блокада 1 ст., блокада левой ножки пучка Гиса, пароксизм желудочковой тахикардии (с реанимацией). Выполнена имплантация двухкамерного кардиовертера-дефибриллятора. Легочная гипертензия (систолическое давление в легочной артерии 50 мм рт. ст.) после перенесенной пневмонии. Пациентка была успешно прооперирована, с улучшением состояния.

Критериями для включения в группу ГЛЖ при артериальной гипертензии были возраст старше 18 лет и установленный диагноз (на основании анамнеза длительно существующего стойкого повышения артериального давления (АД) - показатели систолического артериального давления - ≥ 140 мм. рт. ст., диастолического артериального давления - выше ≥ 90 мм. рт. ст.; при

контролируемой артериальной гипертензии допускается артериальное давление меньших значений), в соответствии с рекомендациями Европейского общества кардиологов. Всем пациентам проводилась коронарная ангиография или мультиспиральная компьютерная ангиография коронарных артерий для исключения гемодинамически значимых стенозов ($>50\%$).

Всего группу ГЛЖ при артериальной гипертензии вошло 13 пациентов (средний возраст 48 ± 4 лет; мужчин 30%; систолическое/диастолическое АД в среднем составило $173,7 \pm 21,7 / 117 \pm 11,4$ мм рт. ст.; толщина МЖП в среднем $12,9 \pm 2,6$ мм; толщина ЗСЛЖ в среднем $12,3 \pm 2,0$ мм).

Критерии исключения из обеих групп: патология клапанов, врожденные пороки сердца, тяжелые сопутствующие заболевания, отсутствие добровольного письменного информированного согласия на участие в исследовании и дальнейшее использование полученных данных в научных целях.

2.3 Молекулярно-генетическое обследование

2.3.1. Выделение ДНК из крови

Материалом для молекулярно-генетического обследования стала ДНК, выделенная из лейкоцитов цельной периферической крови пациентов. Забор венозной крови проводился в объеме от 1 до 9 мл в стерильные одноразовые пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА, с помощью вакуумных систем сертифицированным медицинским персоналом.

Пробирки с биологическим материалом маркировались непосредственно на месте процедуры. Образцы крови хранились при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Выделение ДНК из клеток крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции.

Ход работы:

1. Разморозить образец крови при комнатной температуре.
2. В микропробирку объемом 1,5 мл перенести 400 мкл периферической крови и добавить 1000 мкл буфера для лизиса эритроцитов (водный раствор хлорида аммония - 0,155 М, этилендиаминтетрауксусная кислоты - 0,0001 М,

трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорида - 0,017 М, 2-меркаптоэтанола - 0,007 М)

3. Перемешать с помощью вортиксирования в течение 3 сек. и центрифугировать при 1000 g в течение 3 мин.

4. Отобрать верхнюю фракцию содержимого микропробирки, оставляя примерно 20 мкл, чтобы не нарушить целостность клеточного осадка.

5. Внести в микропробирку 1000 мкл буфера для лизиса эритроцитов (см. выше его состав) и перемешать с помощью вортиксирования до ресуспендирования клеточного осадка.

6. Центрифугировать при 1000 g в течение 3 мин. и отобрать верхнюю фракцию содержимого микропробирки, оставляя примерно 20 мкл, чтобы не нарушить целостность клеточного осадка.

7. Внести в микропробирку 6 е.а. протеиназы К (Евроген, Россия) и перемешать с помощью вортиксирования до ресуспендирования клеточного осадка.

8. Добавить 400 мкл буфера для лизиса лейкоцитов (водный раствор трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорида 0,050 М, этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,0001 М, натрия хлорида 0,150 М, додецилсульфата натрия 1%) и инкубировать микропробирку при +37°C в течение ночи, либо при +55°C в течение 2 часов.

9. Добавить в микропробирку 600 мкл смесь фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соотношении объемов 25:24:1 соответственно, перемешивать в вертикальном ротаторе при 30 об/мин. в течение 10 мин. и центрифугировать при 18000 g. в течение 3 мин.

10. С помощью наконечников с широким горлышком перенести в чистую микропробирку не более 600 мкл верхней фазы содержимого микропробирки, добавить 67 мкл водного раствора ацетата натрия (с концентрацией 3М) и перемешать с помощью вортиксирования в течение 3 сек.

11. Добавить 800 мкл изопропанола, перемешать в вертикальном ротаторе при 30 об/мин. в течение 10 мин. и центрифугировать при 18000 об/мин. в течение 3 мин.

12. Отобрать верхнюю фракцию содержимого микропробирки, не касаясь осадка, добавить 1000 мкл 75% этанола, перемешать в вертикальном ротаторе при 30 об/мин. в течение 10 мин. и центрифугировать при 18000 об/мин. в течение 3 мин.

13. Отобрать верхнюю фракцию содержимого микропробирки максимально, не касаясь осадка, и оставить микропробирку, не закрывая крышку, при комнатной температуре до полного высыхания спирта.

14. Добавить в микропробирку 50 мкл воды и инкубировать при комнатной температуре в течение ночи, либо при температуре 37°C в течение 4 часов, либо при температуре 55°C в течение 1 часа.

Оценка качества и количества выделенной геномной ДНК проводилась при помощи спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Scientific, США). Кроме общих требований к качеству ДНК, необходимым требованием в настоящей работе являлось значение среднего размера получаемых фрагментов геномной ДНК – более 10 т.п.н., в связи с большой длиной ПЦР-продуктов при амплификации ДНК. Средняя длина полученных фрагментов ДНК определялась с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле с содержанием бромистого этидия и визуализацией результатов на приборе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США). Хранение образцов ДНК осуществлялось при -20°C в биобанке НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ.

2.3.2 Массовое параллельное секвенирование

Исследование нуклеотидной изменчивости методом массового параллельного секвенирования осуществлялось с помощью технологии NGS (Illumina, США).

2.3.2.1 Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование

Подготовка ДНК-библиотек для 12 пациентов с ГКМП проводилась с помощью набора реагентов TruSight Rapid Capture и TruSight Cardiomyopathy Sequencing Panel (Illumina, США), у 15 пациентов с ГКМП – набора SureSelect Focused Exome (Agilent, США), а для 4 пациентов – таргетного секвенирования с помощью набора Nextera DNA Flex (Illumina, США) полной нуклеотидной последовательности генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*, полученной при помощи ПЦР длинных фрагментов ДНК с праймерами, подобранными самостоятельно (Приложение А).

Набор TruSight Cardiomyopathy Sequencing Panel позволяет оценить кодирующую и прилегающую интронную последовательность 46 генов, ассоциированных с наследственными кардиомиопатиями, а набора SureSelect Focused Exome (Agilent, США) - 4800 генов, связанных с наследственными заболеваниями.

Входная концентрация ДНК составила 50 нг для каждого образца. Далее для выполнения анализа был подготовлен пул образцов ДНК пациентов с ГКМП. ДНК-библиотеки были приготовлены в соответствии с протоколом целевого обогащения и просеквенированы на приборах MiSeq и HiSeq 2500 (Illumina, США) с длиной прочтения 2*150 п.н.

2.3.2.2 Подбор праймеров и ПЦР-амплификация исследуемых длинных фрагментов ДНК

Для выполнения таргетного секвенирования полной нуклеотидной последовательности генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* была подобрана панель праймеров с целью формирования пула длинных ПЦР-продуктов для последующего приготовления ДНК-библиотек (Приложение А). Последовательности получаемых ПЦР-продуктов перекрывались друг с другом, что позволило обеспечивать при секвенировании достаточное покрытие участков на концах этих ПЦР-продуктов.

Подбор последовательности праймеров осуществлялся с помощью интернет-инструмента NCBI Primer Blast [Ye J. et al., 2012]. Предварительный расчет температур плавления, образуемых вторичных структур праймеров, гомо- и гетерополимеров проводился с помощью интернет-ресурса IDT Olygo Analyzer Tool [<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>]. Специфичность выбранных пар праймеров дополнительно оценивалась с помощью интернет-ресурса BiSearch Primer Design and Search Tool [Arányi T. et al., 2006].

Амплификацию исследуемых фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции длинных фрагментов (LR PCR) в отдельных пробирках на программируемых амплификаторах Veriti (Thermo Scientific, США). Программа амплификации включала в себя 3 этапа, которые представлены в таблице 6. Для постановки реакций использовались готовые реакционные смеси БиоМастер LR HS-ПЦР (2х) (БИОЛАБМИКС, РФ), БиоМастер LR HS-ПЦР color (2х) (БИОЛАБМИКС, РФ), Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколами фирм-производителей.

Таблица 6. Этапы и условия проведения ПЦР длинных фрагментов ДНК

Этап	Название	Температура	Время
1 этап: 1 цикл	Предварительная денатурация	94–96°C	30 сек. – 5 мин.*
2 этап: 30–35 циклов	Денатурация	94–96°C	30 сек.
	Отжиг праймеров	60–68°C	30 сек.
	Элонгация	68–72°C*	30 сек. – 1 мин./Кб*
3 этап: 1 цикл	Финальная элонгация	68–72°C*	5–10 мин.
	Хранение	10°C	Без ограничений по времени

Примечание: * – в зависимости от используемого набора для амплификации.

Для проведения части реакций в готовую реакционную смесь вносился SE-стабилизатор ПЦР (СибЭнзайм, РФ). Отработка условий LR PCR проводилась экспериментально путем подбора оптимальных значений следующих параметров: количество циклов ПЦР, температура отжига праймеров, концентрация SE-стабилизатора. Входная концентрация образцов ДНК составила 150–200 нг.

Результаты ПЦР оценивались методом гель-электрофореза ДНК в 1% агарозном геле и визуализацией на приборе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США).

2.3.2.3 Биоинформатический анализ

Анализ данных NGS осуществлялся в соответствии с рекомендациями GATK [<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>]. Демультиплексирование, выравнивание полученных последовательностей ДНК на референсный геном (сборка GRCh38), поиск вариантов проводились с использованием инструментов GATK (версия 4.2.6.1). Аннотация выявленных вариантов осуществлялась с помощью инструмента Annovar [Wang K. et al., 2010]. Для оценки качества полученных данных использовались инструменты BCFtools (версия 1.15) [Danecek P. et al., 2021], MultiQC (версия 1.12) [Ewels P. et al., 2016], FastQC (0.11.9) [<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>], QualiMap (версия 2.2.1.) [Okonechnikov K. et al., 2016].

2.3.3 Прямое мономолекулярное секвенирование ДНК

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированных длинных фрагментов ДНК генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* у 42 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с гипертрофией левого желудочка при артериальной гипертензии проводилось методом нанопорового мономолекулярного секвенирования по технологии Oxford Nanopore Technologies на приборе MinION.

Данная технология основана на измерении параметров электрического тока, проходящего через нанопору. При прохождении через нанопору молекулы ДНК параметры электрического тока меняются. Характер этих изменений специфичен для каждого нуклеотида, что используется для преобразования сигналов электрического тока в нуклеотидную последовательность.

2.3.3.1 Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование

Структура праймеров и условия ПЦР длинных фрагментов ДНК приведены ранее в разделе 2.3.2.2 (Подбор праймеров и ПЦР-амплификация исследуемых длинных фрагментов ДНК) и Приложении А.

Очистка проб перед началом приготовления ДНК-библиотек для секвенирования осуществлялась с помощью AMPure XP beads (Beckman Coulter, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Для приготовления ДНК-библиотек продукты LR PCR от каждого пациента эквимольно объединялись в пул. Для этого было произведено измерение концентрации амплификата при помощи флуориметра Qubit 4 (Thermo Scientific, США) с использованием готовой реакционной смеси Invitrogen Qubit dsDNA BR (Broad Range) Assay Kit (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя. Значения концентрации (нМ) использовались для вычисления количества вещества (каждого амплификата по формуле: концентрация образца, нг/мкл / (660 г/моль * средний размер библиотеки) * 10^6 .

Полученные пулы ДНК-библиотек образцов были подготовлены к секвенированию с использованием готового набора реакционных смесей по протоколу Native barcoding amplicons (with EXP-NBD104, EXP-NBD114, and SQK-LSK109) в соответствии с протоколом производителя, включающего в себя следующие этапы: 1) восстановление концов молекул ДНК (End-prep); 2) лигирование адаптеров баркодов (Ligation of Barcode Adapter); 3) репарация ДНК и восстановление концов (DNA repair and end-prep); 4) лигирование адаптеров (Adapter ligation); 5) очистка (Clean-up); 6) подготовка и загрузка проточной ячейки (Priming and loading the SpotON flow cell); 7) регистрация данных (профиль сигнала токов) с ячейки MinIon v9.4.1 в течение 48 часов с использованием программного обеспечения MinKNOW (Oxford Nanopore, Великобритания).

2.3.3.2 Биоинформатический анализ

Преобразование профиля сигналов тока в нуклеотидную последовательность и демультиплексирование полученных данных проводили с помощью программного обеспечения «Guppy v.5.0.7».

Выравнивание полученных последовательностей ДНК на референсный геном (сборка GRCh38) проводилось с использованием инструментов «MiniMap2» (v2.17) [Li H., 2018]. После выравнивания просеквенированных последовательностей изучаемых генов на референсные последовательности генома поиск генетических вариантов проводили с применением нескольких алгоритмов: «Nanopolish» (v0.11.1) [Simpson J.T. et al., 2017], «Medaka» (v1.6.0) [<https://github.com/nanoporetech/medaka>] и «Clair3» (v0.1-r11) [Zheng Z. et al., 2021].

2.4 Интерпретация значимости и оценка патогенности найденных генетических вариантов

Оценка патогенности выявленных генетических вариантов с частотой минорного аллеля $\leq 1\%$ или $\geq 99\%$ (среди европейцев, за исключением финнов (NFE)), указанной в базе данных The Genome Aggregation Database (GnomAD) [Karczewski K.J. et al., 2020; <https://gnomad.broadinstitute.org/>], охарактеризована с учетом стандартов и критериев по интерпретации вариантов секвенирования Американской Коллегии Медицинской Генетики/Ассоциации Молекулярной Патологии (ACMG/AMP) [Richards S. et al., 2015], руководства по интерпретации данных высокопроизводительного секвенирования [Рыжкова О.П. и др., 2019] и онлайн-калькулятора, созданного в Медико-генетическом научном центре РАН [<http://calc.generesearch.ru/>], а также специализированных для кардиомиопатий рекомендаций [Elliott P.M. et al., 2014; Ommen S.R. et al., 2020]. Клинически значимыми признавались генетические варианты, классифицированные как патогенные или условно-патогенные, согласно критериям ACMG.

Для характеристики генетических вариантов также использовался инструмент Varsome [Kopanov S. et al., 2019] и VannoPortal

[<http://www.mulinlab.org/vportal/index.html>], база данных генетических вариантов RUSeq [Barbitoff Y.A. et al., 2021; <http://ruseq.ru/#/>], GnomAD [<https://gnomad.broadinstitute.org/>], Genotype-Tissue Expression (GTEx) project [<https://www.gtexportal.org/home/>], GWAS catalog [<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>], RegulomeDB v. 2.2 [<https://regulomedb.org/regulome-search/>].

Положение переменных аминокислот в третичной структуре белка определяли с использованием ресурса AlphaFold Protein Structure Database [Jumper J. et al., 2021; Varadi M. et al., 2021]. Аллель-специфичное связывание факторов транскрипции анализировали с помощью онлайн-ресурса ADAstra [<https://adastra.autosome.org/bill-cipher>]. Программа TargetScan v. 8.0 использовалась для предикции сайтов связывания гена *TPM1* с микроРНК [https://www.targetscan.org/vert_80/].

Взаимодействие РНК-связывающих белков с последовательностью 3'UTR *TPM1* предсказано с использованием онлайн-веб-сервера RBPmap [<http://rbpmap.technion.ac.il/index.html>]. Вторичная структура мРНК и минимальная свободная энергия (minimum free energies или MFE) 3'UTR основного транскрипта *TPM1* при референсном и альтернативном аллелях rs8519 были сгенерированы с использованием онлайн-сервера RNAfold [<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>].

2.5 Подтверждение клинически значимых генетических вариантов с помощью секвенирования по Сэнгеру

Валидация идентифицированных клинически значимых генетических вариантов в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* осуществлялась при помощи прямого двунаправленного секвенирования по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

ПЦР проводилась с использованием готовых реакционных смесей БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×), БиоМастер LR HS-ПЦР (2×)

(БИОЛАБМИКС, РФ) и подобранными праймерами (Приложение Б) в соответствии с протоколом фирмы-изготовителя.

Для очистки ПЦР продуктов использовали набор реагентов: термолабильная экзонуклеаза Eho I (Thermo Scientific, США), термолабильная щелочная фосфатаза креветки SAP (Thermo Scientific, США), вода деионизованная, ПЦР-продукт.

Ход работы:

1. Приготовление реакционной смеси: 1 е.а. фосфатазы, 1 мкл воды деионизованной, 1 е. а. экзонуклеазы.
2. ПЦР-продукт обработать реакционной смесью. Оставить на 40 мин. при температуре +37°C для расщепления оставшихся праймеров в ПЦР-продукте и удаления dNTP.
3. Затем оставить на 20 мин. при температуре +80°C для инактивации ферментов.

Для последующей постановки секвенирующей реакции использовали набор реагентов: секвенирующий набор BigDye Sequencing kit v3.1 (Thermo Scientific, США), 5X секвенирующий буфер, праймер прямой или обратный, ПЦР-продукт, вода деионизованная.

Ход работы:

1. Приготовление реакционной смеси: 1 мкл BigDye Sequencing kit v3.1, 1,5 мкл секвенирующего буфера, 2,5 пмоль праймер, 0,4 мкл праймера, 10 мкл деионизованной воды, 1–2 мкл ПЦР-продукта.
2. Внести очищенный от праймеров и dNTP ПЦР-продукт в реакционную смесь. Программа амплификации состояла из 25 циклов, включающих следующие шаги: 96°C – 25 сек., 50°C – 15 сек., 60°C – 2 мин.

Для очистки продуктов секвенирующей реакции использовали набор реагентов D-Pure (Nimagen, Нидерланды). Очистку проводили согласно протоколу, прилагаемому к набору.

Ход работы:

1. К 10 мкл амплификата добавляли 10 мкл предварительно тщательно перемешанных магнитных частиц.
2. Далее к полученному объему добавляли по 42 мкл 80% раствора этилового спирта с одновременным пипетированием для перемешивания.
3. Помещали пробирки на 2 мин. на магнитный штатив с последующим удалением супернатанта.
4. Далее добавляли по 100 мкл 80% этилового спирта в каждую лунку и выдерживали 30 сек.
5. Затем не убирая пробирки с магнитного штатива удаляли этанол и повторяли предыдущий шаг.
6. После аспирации остатков спирта убирали пробирки с магнитного штатива и высушивали содержимое пробирок в течение 5–10 мин., не пересушивая.
7. Добавляли 40 мкл элюирующего буфера (0,1 мМ р-р ЭДТА, рН=8,0 или деионизированную воду), перемешивали содержимое пробирок и оставляли инкубироваться при комнатной температуре в течение 5 мин.
8. Помещали пробирки на магнитный штатив и ждали 3 мин. до того, как раствор станет прозрачным.
9. Не убирая с магнитного штатива, отбирали из пробирок по 30–35 мкл раствора в новые плашки, совместимые с секвенатором 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США). Образцы готовы к анализу.

Визуализацию и анализ результатов секвенирования ДНК по Сэнгеру осуществляли с помощью программного обеспечения UGENE (v42.0 Unipro, Россия) [Okonechnikov K. et al., 2012].

2.6 Статистический анализ данных

Для оценки полученных данных и выявления статистически значимых различий был использован пакет прикладных программ «Statistica v.10». Сравнительный анализ средних значений признаков в группах проведен с

использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Проверку соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга проводили с помощью критерия χ^2 или точного теста Фишера. Гаплотипы оценивались с помощью алгоритма «Clair3» (v0.1-r11), а их визуализация выполнена в программе «Haploview» [Barret J.C. et al., 2005; Zheng Z. et al., 2021].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные о последовательности пяти генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) с помощью нанопорового секвенирования ДНК получены в четырех экспериментах. В первых трех экспериментах обследован 42 человека с диагнозом ГКМП, а в четвертом – 24 человека, из них 8 – с диагнозом ГКМП и 13 человек – с диагнозом гипертрофии левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии. Кроме того, у 4 пациентов с ГКМП нуклеотидная последовательность изучаемых генов, кроме нанопорового секвенирования, была проанализирована с помощью массового параллельного секвенирования.

Для расширения выборки ГКМП привлечены данные по секвенированию кодирующих экзонов исследуемых генов на секвенаторах Illumina (США). Данные по экзонным последовательностям *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* извлечены из результатов секвенирования панели 46 генов «TruSight Cardiomyopathy» (12 человек) и секвенирования клинического экзема «SureSelect Focused Exome» (15 человек).

3.1 Исследование нуклеотидной изменчивости в экзонах генов саркомерных белков у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

У пациентов с ГКМП (n=77) выявленные клинически значимые варианты (патогенные, вероятно патогенные и VUS) приводили к миссенс заменам аминокислот, образованию стоп-кодона, делеции одной аминокислоты, сдвигу рамки считывания. В таблице 7 и в подразделе ниже приведено описание спектра 20 патогенных, вероятно патогенных и VUS вариантов, которые были зарегистрированы в гетерозиготном состоянии в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2* и *TNNI3* у пациентов с ГКМП и, следовательно, могут рассматриваться как причина заболевания. Однако у пациентов с гипертрофией левого желудочка (n=13), как следствия артериальной гипертензии, клинически значимых вариантов зарегистрировано не было.

Таблица 7. Спектр патогенных, вероятно патогенных и VUS вариантов в генах *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2* и *TNNI3* у пациентов с ГКМП

Замена в кДНК (rs)	Замена в белке	Технология/ алгоритм поиска вариантов	Оценка патогенности	Число пациентов с вариантом
Ген <i>MYBPC3</i>				
c.C3697T (rs397516037)	p.Gln1233Ter	ONT, NGS/Medaka, Clair, Annovar	P	4
c.1543_1545del (rs730880643)	p.515_515del	NGS/Annovar	LP	1
c.1271dup	p.Ser424Argfs Ter21	ONT/Nanopolish, Clair	LP	1
c.C1433G (rs730880540)	p.Ser478Trp	NGS/Annovar	LP	1
c.G223A (rs375471260)	p.Asp75Asn	ONT/Nanopolish, Clair	VUS	1
c.G2955T	p.Lys985Asn	ONT/Nanopolish, Clair	VUS	1
c.2320G>A (rs368104687)	p.Ala774Thr	ONT/Medaka, Clair	VUS	1
Ген <i>MYH7</i>				
c.G2609A (rs36211715)	p.Arg870His	ONT, NGS/Nanopolish, Clair, Annovar	P	2
c.C727T (rs397516265)	p.Arg243Cys	ONT/Nanopolish, Clair	P	1
c.G2156A (rs121913641)	p.Arg719Gln	ONT/Nanopolish, Clair	P	1
c.G1977A (rs1241603111)	p.Met659Ile	NGS/Annovar	LP	1
c.T2141G	p.Leu714Arg	ONT/Nanopolish, Clair	LP	1
c.T1825A	p.Tyr609Asn	ONT/Nanopolish, Clair	LP	1
Ген <i>TNNT2</i>				
c.C862T (rs121964857)	p.Arg288Cys	NGS/Annovar	LP	1
Ген <i>TNNI3</i>				
c.A401G (rs727503505)	p.Asp134Gly	ONT/Medaka, Clair	LP	1
Ген <i>TPMI</i>				
c.A305G	p.Glu102Gly	ONT/Medaka, Clair	LP	1

Примечание: ONT – нанопоровое секвенирование, NGS – массовое параллельное секвенирование; Оценка патогенности по ACMG (Varsome); P – патогенный вариант, LP – вероятно патогенный вариант, VUS – вариант «неизвестного значения».

3.1.2. Выявленные кандидатные варианты и оценка их патогенности

3.1.2.1 Ген *MYBPC3*

У пациентов с ГКМП в гене *MYBPC3* выявлено 4 патогенных, 3 вероятно патогенных и 3 VUS варианта (Таблица 7, Рисунок 8).

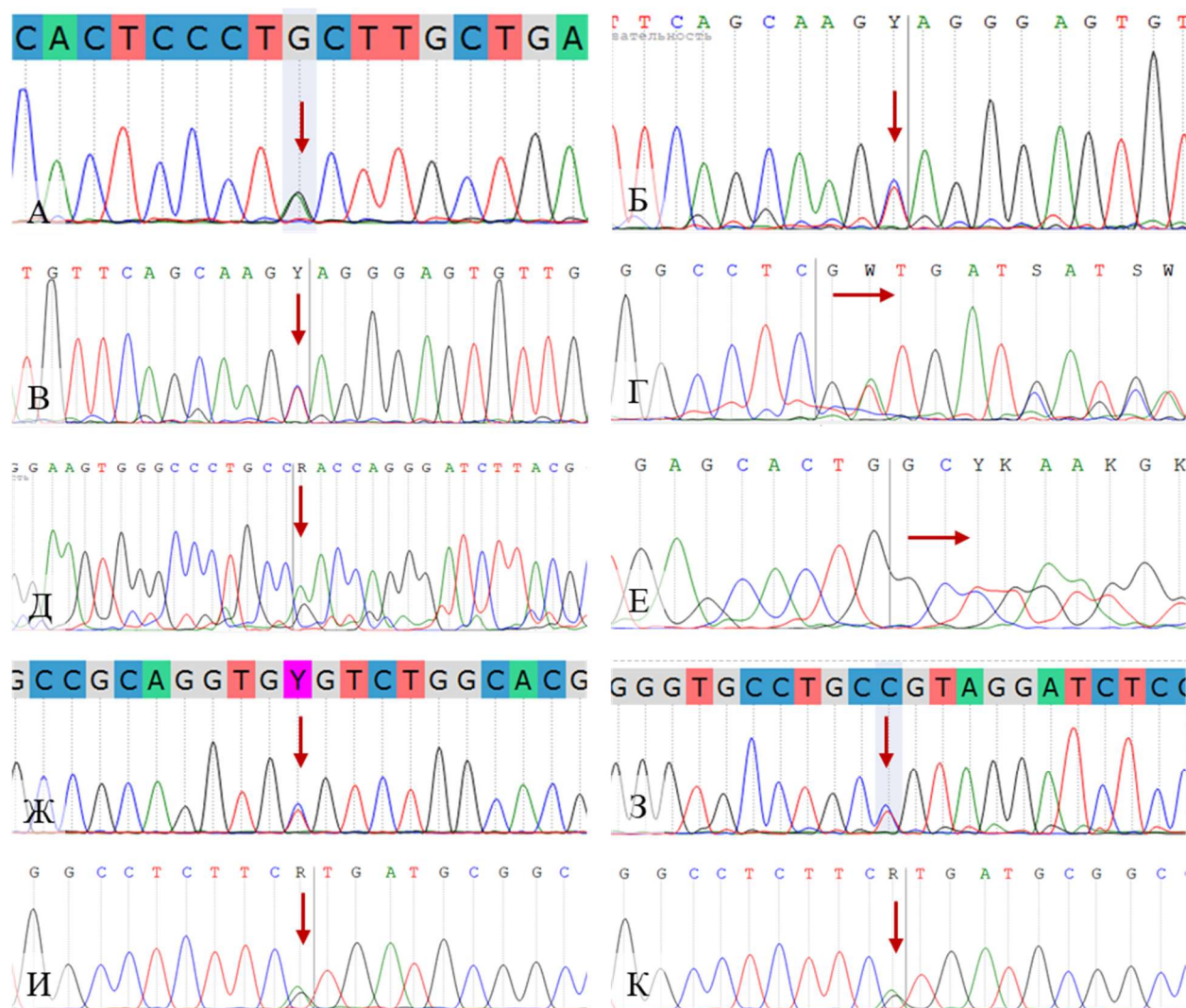


Рисунок 8. Подтверждающее молекулярно-генетическое тестирование идентифицированных вариантов в гене *MYBPC3* с помощью секвенирования по Сэнгеру у пациентов с ГКМП. А, Б, В – c.3697T (p.Gln1233Ter) у трех разных пациентов; Г – c.1543_1545del (p.515_515del); Д – c.G223A (p.Asp75Asn); Е – c.1271dupG (p.Ser424fs); Ж – c.G2320A (p.Ala774Thr); З – c.G977A (p.Arg326Gln); И, К – c.G472A (p.Val158Met) у двух разных пациентов.

Вариант с.C3697T (rs397516037) приводит к образованию преждевременного стоп-кодона (p.Gln1233Ter), который укорачивает белок на 42 аминокислоты – это половина последнего Ig-подобного домена. Этот вариант был найден у четырех разных пациентов, у двух – с помощью мономолекулярного секвенирования и других двух – при анализе клинического экзозема. Данный вариант является единственным для нашей выборки, который был зарегистрирован более одного раза в гене *MYBPC3* у неродственных пациентов.

Частота данного нонсенс-варианта в базе данных GnomAD составляет 0,000008, причем он был зарегистрирован только в европейской выборке. В базе данных RUSeq этот вариант отсутствует. Согласно оценке патогенности с помощью онлайн инструмента ACMG Varsome, p.Gln1233Ter является патогенным вариантом. В большой выборке пациентов с ГКМП из США этот вариант был найден у 0,6% пациентов (13 человек) [Kapplinger J.D. et al., 2014]. Также этот вариант был обнаружен в объединенной выборке пациентов из России и Белоруссии [Glotov A.S. et al., 2015].

Известно, что мутации, ведущие к укорочению белка (преждевременные стоп-кодона, сдвиг рамки считывания, мутации сплайсинга) часто встречаются именно в гене *MYBPC3* и характеризуются более ранним началом и высоким риском внезапной смерти, по сравнению с миссенс-мутациями [Erdmann J. et al., 2001]. Кроме того, отмечается, что вариант p.Gln1233Ter обычно встречается вместе с вариантом p.Arg326Gln [Ingles J. et al., 2005] – то есть, по-видимому, сцеплен с ним. Наши пациенты действительно имели оба этих варианта. Кроме того, для p.Gln1233Ter показано практически полное отсутствие транскрипта в миокарде (у гетерозиготы присутствовали только мРНК «дикого типа») [Helms A.S. et al., 2014], что указывает на его подверженность процессу нонсенс-опосредованной деградации мРНК. Считается, что нонсенс-опосредованная деградация мРНК лежит в основе гаплонедостаточности, как механизма реализации мутаций *MYBPC3*, укорачивающих белок [Marston S. et al., 2009; Glazier A.A. et al., 2019].

Вариант c.1543_1545del (rs730880643) представляет собой делецию трех нуклеотидов, что приводит соответственно к делеции одной аминокислоты без сдвига рамки считывания - аспарагина в позиции 515 (p.515_515del). Эта аминокислота расположена в Ig-подобном домене C3 (аминокислоты 453–543), на конце одной из β -нитей, составляющих этот домен.

В базе GnomAD данный вариант встречается с частотой 0,000014, а в европейской части РФ – 0,0001 (RUSeq). В базе данных ClinVar эта замена классифицирована как вариант с неопределенной значимостью [Landrum M. J., et al, 2018; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>]. Однако p.515_515del является вероятно патогенным вариантом, согласно оценке его патогенности с помощью онлайн инструмента ACMG Varsome.

Ранее этот вариант был выявлен у индивида с дилатационной кардиомиопатией [Waldmüller S. et al., 2011]. Кроме того, вариант p.515_515del обнаружен в компаунд гетерозиготном состоянии с вариантом p.Asp610Asn у пациента с клиническим подозрением на митохондриальное заболевание [Puusepp S. et al., 2018].

Инсерция цитозина c.1271dup выявлена у пациента с ГКМП (женщина, 53 года, МЖП 16 мм и ЗСЛЖ 13 мм). Данная мутация приводит к сдвигу рамки считывания (p.Ser424ArgfsTer21) и потере функции белка. Информация о варианте отсутствует в базах данных (ClinVar, GnomAD и RUSeq) и в публикациях PubMed.

Вариант c.C1433G (rs730880540), p.Ser478Trp также обнаружен впервые. В этой позиции известна замена p.Ser478Leu, которая в базе ClinVar и ACMG Varsome определяется как VUS. Большинство программ-предикторов *in silico* оценивают вариант rs730880540 как патогенный (16 из 22). Однако, так как нет данных о ко-сегрегации этого варианта с заболеванием в родословной и других доказательств его патогенности, то в строгом смысле он должен быть классифицирован как вариант неопределенного значения (VUS).

Вариант c.G223A (rs375471260) приводит к замене аспарагиновой кислоты на аспарагин (p.Asp75Asn), которая изменяет заряд белковой молекулы. Asp75 расположена в α -спиральной структуре и образует водородные связи с тремя аминокислотами: Lys54, Gly72 и Tyr79 [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q14896>]. Она входит в N-концевой кардиоспецифичный C0 домен белка, который взаимодействует с регуляторной легкой цепью миозина [Ratti J. et al., 2011].

В базе ClinVar эта замена оценена в большинстве случаев как вариант неизвестного значения (и в одном случае как вероятно патогенный). Данный вариант отсутствует в RUSeq. База VarSome оценивает его как VUS на основе того, что он редко встречается в популяциях (0,00002 в GnomAD) и большинство предикторов относят его к VUS. Однако предиктор PolyPhen дает этому варианту максимальный балл (1,00), с учетом высокой консервативности этой аминокислоты (и всего участка белка) среди различных видов животных.

Миссенс замена p.Asp75Asn была идентифицирована у 66-летней пациентки с ГКМП в Испании [Rodríguez-García M.I. et al., 2010] и пациента с дилатационной кардиомиопатией в Португалии [Sousa A, et al., 2019].

Вариант c.G2955T (p.Lys985Asn) выявлен нами впервые. Замена гуанина на урацил в мРНК (NM_000256: c.G2955T), а в геномной последовательности – цитозина на аденин (так как ген расположен на минус-цепи) ведет к замене положительно заряженной аминокислоты лизина на полярный незаряженный аспарагин в иммуноглобулиновом домене C6 белка, меняя заряд белковой молекулы. Lys985 образует водородные связи с аминокислотами Val991 и Val1063 и участвует, таким образом, в формировании третичной структуры белка [<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q14896>]. Вариант выявлен у пациентки 46 лет с умеренной асимметричной гипертрофией левого желудочка, выраженной в области межжелудочковой перегородки.

Программы-предикторы эффекта для данной миссенс-замены дают противоречивые результаты. Из 20 предикторов Varsome, 2 предсказывают эффект этого варианта как «вредный», 8 – как «benign» или «tolerated», и 10 дают

неоднозначные результаты. Кроме того, отмечается, что лизин в этой позиции не является консервативным. Однако алгоритм PolyPhen-2 классифицирует этот вариант как вероятно патогенный (possibly damaging), и если рассмотреть подробно выравнивание белковых последовательностей различных видов, то выясняется, что «неконсервативность» этой позиции обусловлена тем, что вместо лизина в ней встречается аргинин – также положительно заряженная аминокислота. Ни у одного вида в этой позиции не выявлен аспарагин.

Таким образом, данный вариант можно рассматривать как предположительно патогенный вариант, однако на настоящий момент он должен быть классифицирован как вариант неопределенного значения, учитывая отсутствие дополнительных доказательств в пользу его патогенности.

Миссенс вариант c.2320G>A (rs368104687, p.Ala774Thr) зарегистрирован в базах данных GnomAD и RUSeq: частота аллеля 0,00001 и 0,0002 соответственно. В ClinVar, ACMG Varsome и в большинстве шкал патогенности данный вариант обозначен как VUS. В публикациях отмечается сочетание данной мутации с p.Ala323Val в гене *ACTC1* у пробанда, в семье которого отмечены случаи внезапной сердечной смерти [Maron B.J. et al., 2012].

В гене *MYBPC3*, кроме патогенных, вероятно патогенных и вариантов «неизвестного значения», выявлены доброкачественные варианты c.G977A (rs34580776, p. Arg326Gln), c.G565A (rs11570052, p.Val189Ile) и c.472G>A (rs3729986, p.Val158Met; Рисунок 8).

Вариант c.G977A (rs34580776, p. Arg326Gln) известен давно и был описан как мутация в самых первых работах по генетике кардиомиопатии и, по-видимому, представляет собой популяционный полиморфизм, частота которого колеблется в разных популяциях, но не превышает 1%, за исключением популяции финнов, где этот вариант встречается с частотой 1,5% (данные GnomAD). В европейской части России его популяционная частота еще выше и составляет около 3% (данные RUSeq). Анализ структуры белка, однако, указывает на то, что эта аминокислота входит в состав α -спирали и участвует в образовании

водородных связей, поддерживающих эту структуру. Предикторы SIFT, Mutation taster и Mutation assessor относят его к патогенным. Таким образом несмотря на то, что данный вариант должен быть отнесен к «доброкачественным» (“benign”) на основании его присутствия у здоровых индивидов, нельзя полностью исключить его влияние на структуру белка, и может быть, его стоит рассматривать как дополнительный вариант с малым эффектом.

Вариант c.G565A (rs11570052), который приводит к замене валина 189 на изолейцин (p.Val189Ile) – известный вариант, частота которого в популяции Европейской части России – около 0,5%. Валин 189 расположен в области α -спирали, не образует водородных связей с другими аминокислотами, поэтому его замена на изолейцин с большой вероятностью не влияет на структуру и функцию белка. Согласно принятым критериям, он может быть классифицирован как «доброкачественный» и является, таким образом, редким миссенс-полиморфизмом.

Другой «доброкачественный» вариант c.472G>A (rs3729986, p.Val158Met) выявлен как у 6 пациентов с ГКМП, так и у трех при гипертрофии левого желудочка в результате артериальной гипертензии. Частота rs3729986 в GnomAD 7%, а в RUSeq – 8%.

Ранее было показано, что в выборке бразильских пациентов с ГКМП частота минорного аллеля данного варианта, связанного с риском развития тяжелой гипертрофии левого желудочка, составляет 4,55% [Mori A.A. et al., 2021]. Предполагается, что замена p.Val158Met нарушает конформацию субдомена C0-C3 сMyBP-C и увеличивает чувствительность к кальцию, что приводит к активному взаимодействию актина и миозина, увеличению максимальной силы сокращения и гипертрофии миокарда [Inchingolo A.V. et al., 2019]. С другой стороны, при молекулярном моделировании в случае аминокислоты Met в 158 положении сMyBP-C возможно снижение комплементарности RASK домена с тропомиозином [Mori A.A. et al., 2021].

Согласно базе данных GTEx, данный вариант является eQTL для гена *C1QTNF4*, расположенного на расстоянии около 258 Кб от *MYBPC3*, в тканях ушка правого предсердия и левом желудочке [<https://gtexportal.org/>]. В частности, редкий аллель (A) rs3729986 связан с меньшей экспрессией гена *C1QTNF4*. *C1QTNF4* контролирует продукцию цитокинов и является членом семейства секретируемых белков C1QTNF, которые имеют структурную гомологию как с C1q системы комплемента, так и семейством фактора некроза опухоли [Vester SK et al., 2021].

В отношении патогенеза кардиомиопатии роль *C1QTNF4* неясна, однако другой член данного семейства *C1QTNF9* с одной стороны, способствует поляризации макрофагов и улучшает сердечную функцию после инфаркта миокарда [Liu M. et al., 2019], а с другой – при его избыточной продукции эндотелиальными клетками в капиллярах сердца в ответ на перегрузку давлением вызывает активацию протеин киназы ERK5, гипертрофию миокарда и дисфункцию левого желудочка [Appari M. et al., 2017].

3.1.2.2 Ген *MYH7*

В гене *MYH7* выявлено 3 патогенных и 3 вероятно патогенных варианта при анализе выборки пациентов с ГКМП (n=77; Таблица 7, Рисунок 9).

Вариант c.G2609A (rs36211715), p.Arg870His выявлен у двух пациентов с ГКМП. Аминокислота Arg870 входит в домен S2 - так называемую «шейку» молекулы миозина. Несмотря на то, что аминокислоты аргинин и гистидин имеют один и тот же заряд, они отличаются по ряду характеристик (гидрофильности, размеру, донорно-акцепторным свойствам).

Замена p.Arg870His встречается в популяциях с частотой, соответствующей допустимой для мутаций аутосомно-доминантных заболеваний: $0,4 \cdot 10^{-5}$ в базе GnomAD, а в RUSeq – 0,0001, при этом она выявляется у пациентов разной этнической принадлежности, согласно данным базы ClinVar. Все шкалы

патогенности также определяют данный вариант как «вредный». Таким образом, имеющиеся данные позволяют оценить этот вариант как патогенный.

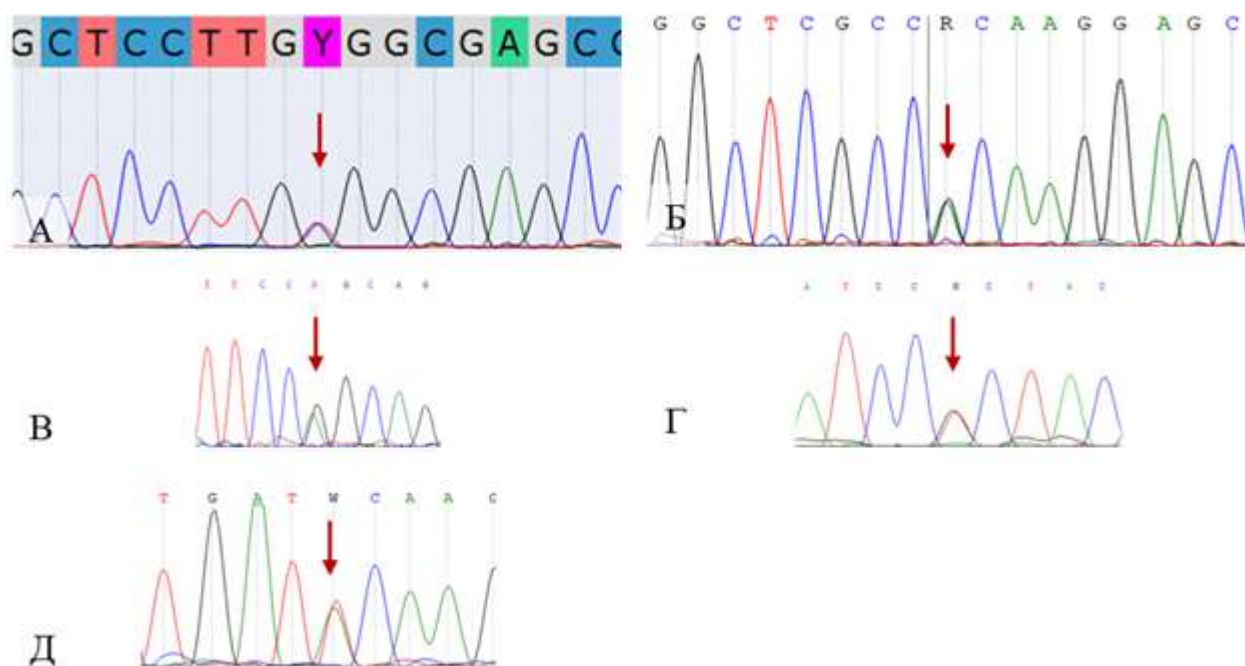


Рисунок 9. Подтверждающее молекулярно-генетическое тестирование идентифицированных вариантов в гене *MYH7* с помощью секвенирования по Сэнгеру у пациентов с ГКМП. А, Б – с.G2609A (p.Arg870His) у двух разных пациентов; В – с.G2156A (p.Arg719Gln); Г – с.T2141G (p.Leu714Arg); Д – с.T1825A (p.Tyr609Asn).

Для этого варианта известно несколько работ, в которых было оценено влияние этой замены на функциональные свойства миозина. Показано, что замена p.Arg870His приводит к снижению аффинности связывания этого участка белка к C1 – C2 доменами миозинсвязывающего белка C [Gruen M. et al., 1999], а также скорости перемещения актиновых и миозиновых филаментов относительно друг друга [Cuda G. et al., 1997]. Исследование трехмерной структуры белка выявило, что так как «головка» миозина генерирует силу сокращения, то мутации в «шейке» и «хвосте» могут приводить либо к нарушению передачи силы сокращения между структурами толстых филаментов, либо к изменению структуры и стабильности белка [Rayment I. et al., 1995].

Вариант c.C727T (rs397516265) представляет собой замену положительно заряженного аргинина на серосодержащую аминокислоту цистеин (p.Arg243Cys). Все программы-предикторы оценивают эту замену как «вредную». В базе GnomAD она выявлена у 1 индивида (европейского происхождения) из 76000 (частота менее $0,7 \cdot 10^{-5}$); в базе RUSeq отсутствует. В базе ClinVar зарегистрировано 9 записей об этом варианте, во всех случаях он обозначен как патогенный или вероятно патогенный. Вариант был ранее выявлен у пациента с ГКМП в Японии [Hirota T. et al., 2010; Kubo T. et al., 2011] и в Китае [Wang J. et al., 2014].

Аргинин 243 расположен в функционально важном моторном домене миозина. Другая замена в этом кодоне, p.Arg243His, также известна как патогенный вариант при кардиомиопатии. Согласно результатам моделирования третичной структуры белка, аргинин 243 образует водородные связи сразу с четырьмя аминокислотами: Glu269, Glu466, Ser241 и Gly231. Таким образом, этот вариант можно отнести к патогенным. В нашей работе замена p.Arg243Cys обнаружена у пациентки 44 лет, с умеренной гипертрофией миокарда левого желудочка.

Вариант c.G1977A (rs1241603111), p.Met659Ile зарегистрирован лишь один раз в базе ClinVar и не отмечен в популяционных базах данных; следовательно, выявленный нами случай является вторым в мире. База VarSome классифицирует этот вариант как вероятно патогенный на основе следующих критериев ACMG: расположение в регионе, который является «горячей точкой» мутаций, консервативность метионина в этой позиции, отсутствие варианта в популяциях, классификация варианта как патогенного практически всеми программами-предикторами, а также базой данных UniProt [<https://www.uniprot.org/>]. Met659 образует водородную связь с Arg663, который, в свою очередь, также является известным сайтом для патогенного варианта Arg663His. Таким образом, мы можем обозначить этот вариант как вероятно патогенный или патогенный.

Вариант, представляющий собой замену с.T1825A в мРНК и p.Tyr609Asn, выявлен нами впервые (нет данных в GnomAD и ClinVar), однако известна мутация p.Tyr609Cys, которая представляет собой замену с.A1826G [Waldmüller S. et al., 2011]. Эта позиция также расположена в «горячей точке» мутаций (23 варианта в 17 позициях), меняет консервативную ароматическую аминокислоту на полярную. Тирозин 609 образует слабую связь с Phe621 путем π -взаимодействия, а также водородные связи с аминокислотами Ser612 и Val605. Замена этой аминокислоты на другую может привести к нарушению третичной структуры белка.

Практически все программы-предикторы определяют эффект этой замены как патогенный. Учитывая отсутствие этого варианта в популяционных базах данных и совокупность доказательство в пользу его патогенности, но, с другой стороны, отсутствие функциональных исследований, доказывающих его эффект, а также доказательство ко-сегрегации с заболеванием в родословных, следует оценить его как вероятно патогенный.

Вариант с.T2141G (p.Leu714Arg) описан нами впервые. Аминокислота Leu714 расположена в так называемом конвертерном домене. Анализ модели третичной структуры белка показывает, что эта аминокислота образует только одну водородную связь – с Phe718. Однако замена неполярного лейцина на положительно заряженный аргинин меняет заряд белковой молекулы, что может иметь последствия для структуры и функции белка, особенно если учесть, что в этом участке уже расположено несколько положительно заряженных аминокислот (Arg703, Arg706, Lys707, Arg712, Arg719, Arg721, Arg723).

В данном случае вариант был выявлен в семье, где пробанд и его сын страдали ГКМП, и оба имели этот вариант. У здорового брата пробанда этот вариант отсутствовал. У пробанда заболевание привело к развитию тяжелой хронической сердечной недостаточности и смерти, а у его сына наступила внезапная сердечная смерть в возрасте 19 лет.

На основании расположения варианта в функционально значимом домене белка и в «горячей точке» мутаций (26 миссенс-мутаций в 17 позициях), высокой консервативности лейцина в этом положении, отсутствия данного варианта в популяционных базах данных RUSeq и GnomAD, а также ко-сегрегации варианта с заболеванием в семье, его можно отнести к категории патогенных.

Конвертер – это участок в моторном домене миозина, который состоит из 78 аминокислот (709–777), формирующих «гнездо» для «шейки» миозина. Здесь расположены сайты связывания двух легких цепей миозина. «Шейка» миозина служит «рычагом», который усиливает конформационные изменения, происходящие в конвертерном домене при гидролизе АТФ [Holmes K.C., 1997]. Участок миозина, формирующий конвертер, особенно «обогащен» мутациями у пациентов с ГКМП [Homburger J.R. et al., 2016], и было показано, что эти мутации влияют на эластичность миофибрилл и формирование мостиков с актином при сокращении [Seeböhm B. et al., 2009], а заболевание вследствие мутаций в конвертере характеризуется более ранним началом и более тяжелым течением [García-Giustiniani D. et al., 2015], что подтверждается клиническими данными наших пациентов.

Вариант c.G2156A (rs121913641), p.Arg719Gln – еще один вариант в конвертерном домене тяжелой цепи бета-миозина, который выявлен у пациента с ГКМП, обследованного в возрасте 36 лет. Вариант классифицирован в базах данных как патогенный. Эта позиция в белке представляет собой особенно «горячую точку» для мутаций: в базах данных зарегистрировано, кроме p.Arg719Gln, еще два патогенных варианта: p.Arg719Trp и p.Arg719Pro [Homburger J.R. et al., 2016]. Для мутации p.Arg719Trp было проведено функциональное исследование изолированных волокон *M. soleus*, полученных от пациента, которое показало, что в случае этой мутации имеет место усиление генерации силы мышечного сокращения и повышенная жесткость волокон. Оба этих показателя в мышечных волокнах пациента были выше нормы примерно на 50% [Köhler J. et al., 2002]. Повышенная жесткость мышечных волокон может

означать нарушение способности к возвращению саркомера в исходное состояние после цикла сокращения. Также было показано, что носители этой мутации имеют пониженную выживаемость [García-Giustiniani D. et al., 2015].

Вариант c.C4472G (rs3729823), p.Ser1491Cys является доброкачественным. Замена p.Ser1491Cys находится в «хвостовом» домене миозина. В этой части белка выявлено меньше патогенных вариантов, чем в «головке» и «шейке», однако они также заслуживают рассмотрения. Судя по данным, приведенным в базе данных ClinVar, этот вариант был признан «доброкачественным» (benign) в результате оценки экспертами, в том числе благодаря значительной частоте в популяциях — 0,8% [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/43020/?new_evidence=true]. Его частота в российских популяциях (база RUSeq) также составляет около 0,8%, а у населения Кавказа достигает 1,3%.

3.1.2.3 Гены *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*

В генах тропонина T2, тропонина I3 и α -тропомиозина выявлено по одному вероятно патогенному варианту (n=77) (Таблица 7, Рисунок 10). Все они представлены миссенс-заменами.

Выявленный вариант c.C862T (rs121964857, p.Arg288Cys) в гене *TNNT2* аналогичен мутации, выявленной в одном из первых исследований генетики ГКМП [Watkins H. et al., 1995]. Эта замена встречается в популяционных выборках с частотой не более 0,07% и была зарегистрирована в популяциях преимущественно европейского происхождения. В отличие от замены p.Lys263Arg, этот вариант приводит к замене положительно заряженной аминокислоты на алифатическую серосодержащую аминокислоту, которая потенциально может влиять на третичную структуру белка.

Для данного варианта получены доказательства его патогенной значимости путем экспериментов *in vitro*, в которых было показано, что мутантный белок приводит к нарушению ингибиторной функции тропонина I и усилению

нейтрализующей функции тропонина С в цикле сокращения, хотя эти эффекты были выражены слабее, чем для мутаций p.Arg92Gln, p.Phe110Ile, и p.Glu244Asp [Takahashi-Yanaga F. et al., 2001]. Таким образом, согласно совокупности критериев, этот вариант относится к вероятно патогенным и с высокой вероятностью является причиной заболевания у пациента. Следует отметить, что этот вариант был также найден у пациента с дилатационной кардиомиопатией [Millat G. et al., 2011].

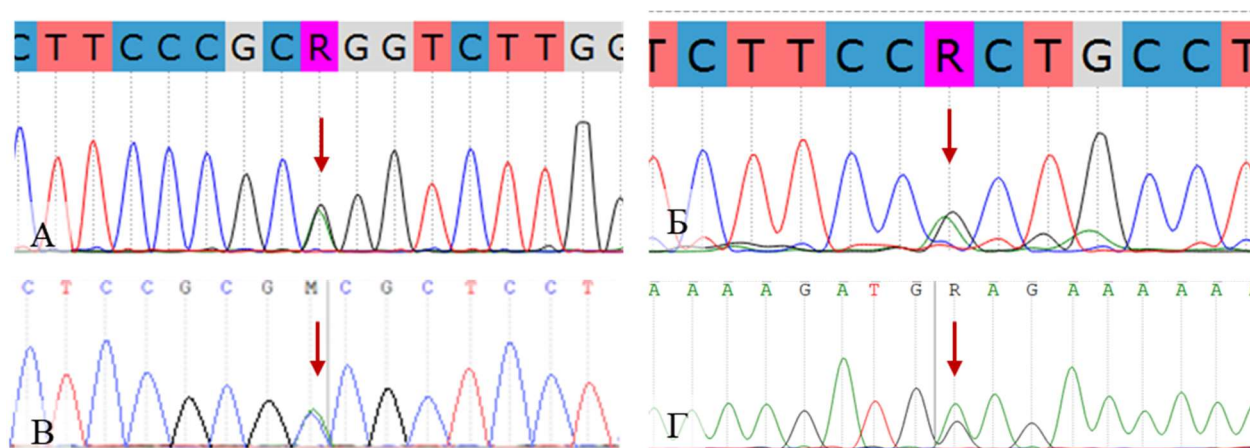


Рисунок 10. Подтверждающее молекулярно-генетическое тестирование идентифицированных вариантов с помощью секвенирования по Сэнгеру у пациентов с ГКМП. А – с.С862Т (p.Arg288Cys) в гене *TNNT2*, Б – с.С113Т (p.Ala38Val) в гене *TNNT2*; Б – с.Г204Т (p.Arg68Arg) в гене *TNNI3*; Г – с.А305Г (p.Glu102Gly) в гене *TPM1*.

Гетерозиготный миссенс-вариант с.С113Т (rs200754249), p.Ala38Val в гене *TNNT2* найден у одного пациента с гипертрофией левого желудочка, вследствие артериальной гипертензии. Это единственный кандидатный вариант, выявленный не у пациентов с ГКМП. В базе данных ClinVar имеются противоречивые данные о функциональной значимости данного варианта: из 17 записей, в одной он был классифицирован как патогенный, в 5 – как вариант неизвестного значения, в 11 – как нейтральный. Частота альтернативного аллеля в базе данных GnomAD = 0,000447; в базе RUSeq – 0,1%. Это выше порога, предлагаемого для аутосомно-доминантных заболеваний. Аланин 28 не является консервативным: у 10 видов млекопитающих в этой позиции находится валин. Учитывая тот факт, что эта

замена была выявлена нами у пациента с диагнозом ГЛЖ, а не ГКМП, она может быть отнесена к категории “benign”. Однако, с другой стороны, учитывая то, что этот вариант расположен в «неупорядоченной» (disordered) части белка, которая может быть важна функционально, и база данных UniProt классифицирует его как патогенный, нельзя исключить, что он имеет некоторое функциональное значение [<https://www.uniprot.org/>].

Вариант с.788A>G (rs3730238), p.Lys263Arg в гене *TNNT2* расположен в α -спиральном домене белка и меняет одну положительно заряженную аминокислоту на другую положительно заряженную аминокислоту. Этот вариант был выявлен неоднократно в различных когортах пациентов и является известным полиморфизмом, на который иногда ссылаются как на p.Lys253Arg [García-Castro M. et al., 2007]. Хотя этот участок белка связан с тропонином I, аминокислота Lys263 не участвует в этом взаимодействии [<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pdbe-kb/proteins/P45379/interactions>]. Частота этого варианта в различных популяциях варьирует от 1,5% у европейцев до 15% у африканцев. Таким образом, данный вариант, по-видимому, не оказывает эффекта на структуру и функцию тропонина T и может быть классифицирован как «доброкачественный». В нашей выборке пациентов с ГКМП, rs3730238 идентифицирован у 5 человек в гетерозиготном состоянии.

Вариант с.А401G (rs727503505), p.Asp134Gly в гене *TNNI3* является крайне редким: он отсутствует в популяционных базах данных GnomAD и RUSeq, а в базах ClinVar и VarSome выявлен у только одного пациента. В VarSome этот вариант классифицирован по критериям ACMG как вероятно патогенный, так как меняет консервативную аминокислоту, отсутствует в популяциях, находится в функционально важном сайте связывания тропонина C и актина (в этом сайте известно 26 миссенс-замен, из них 9 патогенных и 17 вариантов неопределенного значения), а программы-предикторы оценивают его как патогенный в 21 случае из 23 [<https://varsome.com/variant/hg38/TNNI3%3Ac.401A%3EG?annotation-mode=germline>].

Кроме того, эта замена меняет общий заряд белка (глутаминовая кислота несет отрицательный заряд, глицин – нейтральная аминокислота). В базе ClinVar, однако, он классифицирован как вариант неизвестного значения, так как указано, что инструменты биоинформатики не могут представить однозначных доказательство ни в пользу, ни против патогенности, и поэтому для уточнения значимости этого варианта необходимы дополнительные данные [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/165518/?new_evidence=true]. Таким образом, наш пациент представляет собой второй в мире случай, который является доказательством в пользу оценки этого варианта как вероятно патогенного.

Частота «доброкачественной» синонимичной замены с.G204T (rs3729711, p.Arg68Arg) в гене *TNNI3* составляет 4% в базах GnomAD и RUSeq. Данный вариант локализован в 5 экзоне гена, в области CpG-островка и сайтов связывания многих транскрипционных факторов в энхансерной области [<http://www.mulinlab.org/vportal/>]. Согласно базе ADAstra v5.1.2, этот вариант может быть связан с аллель-специфичной транскрипцией: аллель А нарушает сайт связывания для фактора транскрипции ZFX_human.

В базе GTEx, rs3729711 является eQTL для гена *PPP6R1* в слизистой оболочке пищевода и гена *TMEM86B* в щитовидной железе, но не в тканях сердца [<https://gtexportal.org/>]. Данный вариант зарегистрирован в гетерозиготном состоянии у трех пациентов с ГКМП и одного пациента с гипертрофией левого желудочка, вследствие артериальной гипертензии.

Наконец, вероятно патогенный вариант с.A305G (p.Glu102Gly), известный в публикациях как p.Glu180Gly, в гене *TPM1* выявлен у пациента с ГКМП и обструкцией ВТЛЖ. В эксперименте на животных моделях мутация p.Glu180Gly приводила к вариабельности ритма сердца и нарушению автономного контроля его работы [Wernicke D. et al., 2007]. Наш пациент – женщина, 51 года, была прооперирована (радиочастотная изоляция устьев правых и левых легочных вен

отдельными коллекторами и радиочастотная абляция ганглионарных сплетений левого и правого предсердий) с целью коррекции фибрилляции предсердий.

Кроме того, при моделировании *in silico* и экспериментах *in vitro* показана связь мутации p.Glu180Gly с нарушением взаимодействия актина и миозина, повышенной сократимостью и диастолическим напряжением кардиомиоцитов [Rysev N.A. et al., 2012; Sewanan L.R. et al., 2016; Kopylova GV et al., 2019].

3.2 Исследование интронной изменчивости генов саркомерных белков у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

3.2.1 Оценка патогенности и регуляторного потенциала некодирующих вариантов

Для оценки патогенности идентифицированных генетических вариантов был применен онлайн-инструмент CADD (версия 1.6) [Rentzsch P. et al., 2021]. CADD – это интегральный подход к оценке функциональной значимости вариантов генома человека, который позволяет оценить патогенность однонуклеотидных вариантов (SNV), а также инсерций и делеций в геноме человека, интегрируя в общей сложности 62 инструмента аннотирования генетических вариантов в единую метрику.

CADD количественно ранжирует функциональные варианты, оценивая широкий спектр функциональных категорий и размер эффекта, а также геномный контекст, и может быть применен для ранжирования диагностически-значимых генетических вариантов. В нашей работе для анализа выявленных генетических вариантов была использована обновленная версия (1.6), дополненная двумя новыми алгоритмами, основанными на машинном обучении. Это позволило повысить качество анализа вариантов, оказывающих влияние на процессы сплайсинга, в т. ч. глубокие интронные варианты.

Для машинного обучения методом опорных векторов с линейным ядром были использованы характеристики, полученные с помощью аннотирования 62

инструментами 29,4 миллиона генетических вариантов (наполовину представленных наблюдаемыми, наполовину смоделированными генетическими вариантами). Те же 62 инструмента аннотации были применены к 8,6 миллиардам возможных замен в референсном геноме человека (сборка GRCh37). После обучения на наблюдаемых и моделируемых генетических вариантах, модель была применена для оценки всех возможных замен. После анализа на основании степени относительности/сродства каждого варианта по отношению ко всем возможным заменам в референсном человеческом геноме каждому генетическому варианту было присвоено две отдельные оценки: «сырая» (“raw”) и «ранжированная» (“scaled”).

«Сырая» оценка вычисляется напрямую и может быть интерпретирована как вероятность того, что вариант скорее будет «наблюдаться» (отрицательные значения оценки) или же скорее будет «симулирован» (положительные значения). Варианты с высокой вероятностью «симуляции» с большей вероятностью обладают патогенным эффектом. «Ранжированная» оценка получена путем оценки 8,6 миллиарда всех возможных SNV референсного генома (сборка GRCh37) и дальнейшего «Phred-ранжирования» полученных значений путем отображения ранга величины, а не точного значения. Например, SNV референсного генома, входящий в 10% шкалы CADD, обозначается CADD-10, входящий в 1% обозначается CADD-20, входящий в 0,1% обозначается CADD-30 и т. д.

Phred-подобное ранжирование $((-10 \cdot \log_{10}(\text{ранг}/\text{общее число}))$ «сырой» оценки относительно всех возможных замен человеческого генома ($8,6 \cdot 10^9$) со значением больше 10 означает, что вариант входит в 10% наиболее патогенных замен, способных возникнуть в человеческом геноме. Значение больше 20 означает вхождение в 1% самых патогенных и так далее. «Сырая» оценка сама по себе не имеет какой-либо интерпретации, однако генетические варианты с более высокими значениями «сырой» оценки предположительно являются более

патогенными. Авторы этого инструмента рекомендуют рассматривать в качестве порогового значение ранга Phred не менее 10.

Анализ CADD был проведен для двух выборок пациентов: 36 человек с диагнозом «ГКМП» и 13 человек с гипертрофией левого желудочка и диагнозом «артериальная гипертензия» (ГЛЖ при АГ). Самыми большими значениями Phred (и соответственно наибольшей вероятностью патогенности) обладали миссенс-замены и нонсенс-варианты генов саркомерных белков (Приложение В). Значения Phred больше 10 также были получены для вариантов, расположенных в интронах (26), промоторах (4) и 3'-UTR анализируемых генов (Приложение В).

Алгоритмы анализа данных, применяемые для результатов нанопорового секвенирования (например, Clair3), позволяют определять гаплотипы, т.е. цис-или транс-положение вариантов относительно друг друга на хромосомах. Варианты, имеющие вероятность функциональной значимости, то есть $Phred > 10$, расположенные в кодирующих и некодирующих областях исследованных генов саркомерных белков, были использованы для анализа структуры и частоты встречаемости образуемых ими гаплотипов в исследованных выборках.

3.2.2. Структура гаплотипов в изученных генах

3.2.2.1 Гены *MYBPC3*, *MYH7* и *TNNI3*

В гене *MYBPC3* не было выявлено гаплотипов, образованных потенциально значимыми вариантами. Всего алгоритм CADD выделил три варианта в этом гене: мутацию стоп-кодона (p.Gln1233Ter) и две миссенс-замены (p.Arg326Gln и p.Ser236Gly). К сожалению, нам не удалось подтвердить сцепление варианта p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln, которое мы предполагали исходя из публикаций об их совместной встречаемости у пациентов [Chakova N.N. и др., 2018]. Границы гаплотипов, в которые входят эти варианты, не перекрываются. По-видимому, это связано с тем, что в области перекрывания двух ПЦР-продуктов для гена *MYBPC3* у данного индивида не было гетерозиготных вариантов.

Частота миссенс-замены p.Ser236Gly среди европейцев составляет 14% (GnomAD), а у жителей РФ ее частота варьировала от 7% (восточная часть) до 12% (Кавказ, RUSeq). Ранее была показана ассоциация варианта rs3729989 с параметрами ЭКГ и индексом массы миокарда левого желудочка, рассчитанном на основании MPT [Verweij N. et al. 2020; Khurshid S. et al., 2023]. В нашей работе у пациентов с ГКМП (n=36) данный вариант встретился в гетерозиготном состоянии у 3 человек и одного пациента с ГЛЖ и АГ.

Согласно базе данных GTEx, в тканях ушка правого предсердия и левом желудочке данный вариант является eQTL для гена *PSMC3*, белковый продукт которого – регуляторная субъединица 26S протеасомы AAA-АТФазы Rpt5, важен для сборки протеосомного комплекса и, соответственно, гомеостаза протеома клетки [<https://gtexportal.org/>]. Данный факт интересен, поскольку показано, что отдельные редкие миссенс-мутации в гене *MYBPC3* индуцируют нарушение убиквитин-протеасомной системы, способствуя дисфункции миокарда при ГКМП [Bahrudin U. et al., 2008].

Кроме того, rs3729989 является eQTL и sQTL для гена *PACSIN3* в ушке правого предсердия и левом желудочке [<https://gtexportal.org/>]. В эксперименте на модельных животных, установлено, что PACSIN3, который входит в семейство белков, участвующих в регуляции клеточного цитоскелета, внутриклеточного транспорта и передачи сигналов, экспрессируется в сердце. Этот белок важен для формирования оптимального количества и морфологии кальвеол в кардиомиоцитах [Seemann E. et al., 2017; Dumont V. et al., 2022].

В гене *MYH7* в качестве потенциально значимых для его функции обозначено 4 варианта: 3 в интронах и один в промоторе. Наиболее частым является вариант rs7159367 (chr14:23418436 T/C), распространенный в РФ с частотой 33% (по данным базы RUSeq). Этот вариант зарегистрирован у 9 пациентов с ГЛЖ вследствие артериальной гипертензии, у одного из них в гомозиготном состоянии (частота аллеля С 38%) и у 8 пациентов с ГКМП, у одного из них также в гомозиготном состоянии (частота аллеля С 32%).

Он расположен в 29 интроне гена, примерно за 30 нуклеотидов до начала экзона 30, в области точки ветвления сплайсинга. Кроме того, далее в этом гене, через 373 п.н., после экзона 30, начинается кодирующая последовательность гена *MIR208B* (chr14:23417987-23418063). Не исключена регуляторная роль данного сайта в экспрессии этой микроРНК. Сравнение с последовательностью других видов млекопитающих показывает, что аллель С в этой позиции является, по-видимому, предковым, так как присутствует, по крайней мере, в геномах макаки резус, собаки и слона (Рисунок 11).

У двух пациентов с ГЛЖ при АГ и одного пациента с ГКМП этот вариант сцеплен с другим значимым (по данным CADD) вариантом: chr14:23414195 C/G (rs41285540), который также расположен ближе к акцепторному сайту сплайсинга в интроне 37 (Рисунок 12). Эта позиция удалена от точки ветвления примерно на 75 нуклеотидов, однако следует отметить, что замена С на G (т.е. G на С на кодирующей минус-цепи) создает консенсусный сайт точки ветвления сплайсинга (YTNA).

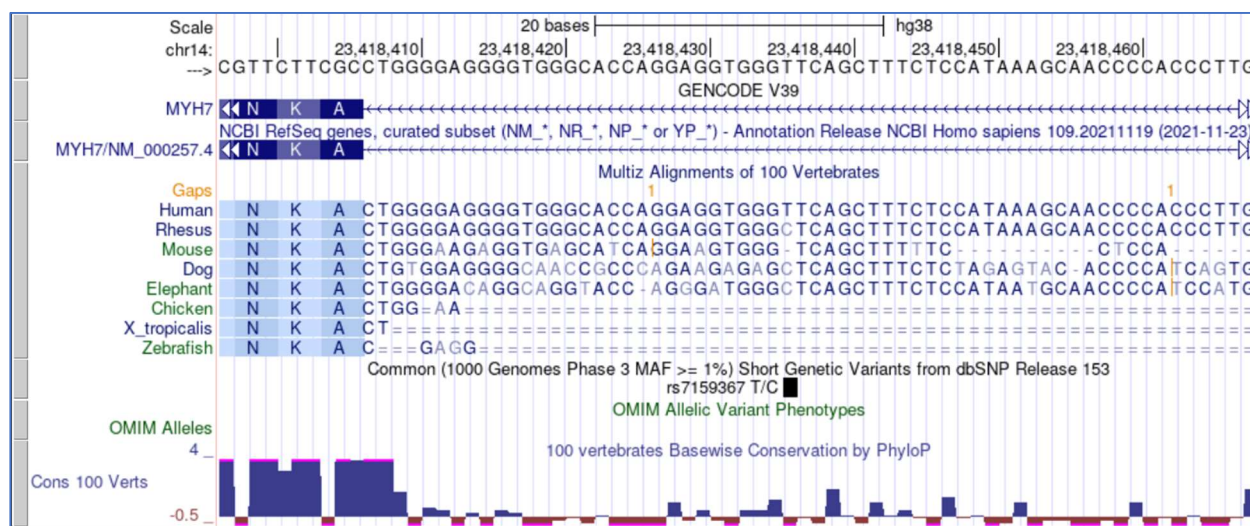


Рисунок 11. Локализация rs7159367 в 29 интроне гена *MYH7* (UCSC Genome Browser, <https://genome.ucsc.edu/>).

Согласно базе данных GTEx, rs41285540 является sQTL для гена *NGDN* в ушке правого предсердия и скелетных мышцах [<https://gtexportal.org/>]. Белок NGDN участвует в биогенезе рибосом, необходимого для многих процессов в

клетках, в том числе вовлеченного в развитие гипертрофии миокарда [Bammert L. et al., 2016; Jiao L. et al., 2023].

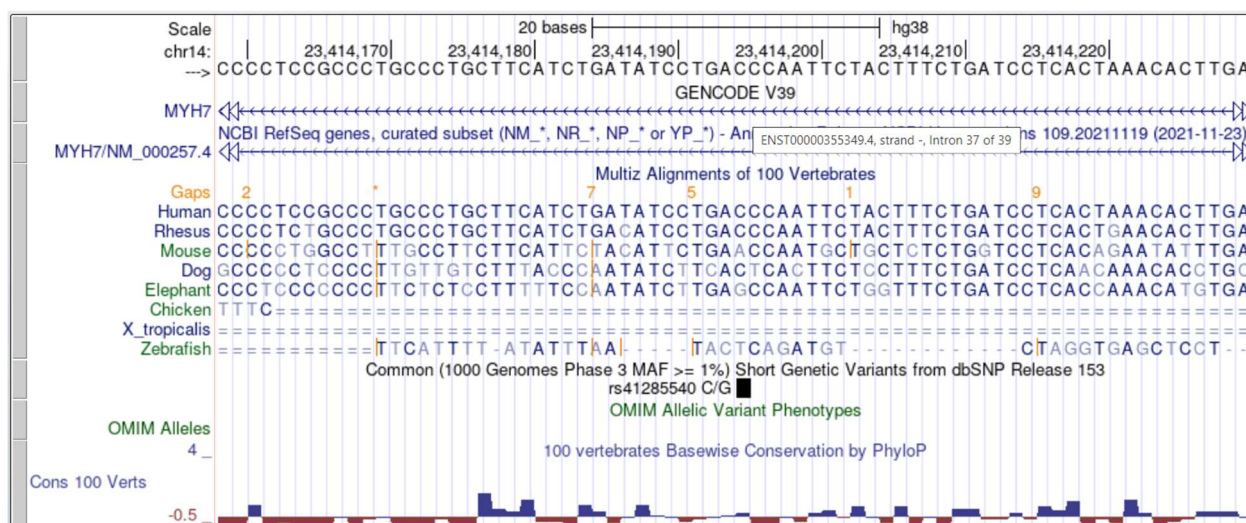


Рисунок 12. Локализация rs41285540 в 37 интроне гена *MYH7* [https://genome.ucsc.edu/].

Кроме того, у одного пациента с ГЛЖ при АГ, в дополнение к этим двум вариантам (и гомозиготного по rs7159367), на том же гаплотипе находится замена chr14:23423053 T>G – этот вариант отсутствует в базах данных.

Наконец, четвертый SNP, с самым высоким значением Phred (20,2), выявленный у двух пациентов с ГКМП, локализован в промоторе и не сцеплен с другими рассматриваемыми вариантами в *MYH7*. Это rs112635270 с геномными координатами chr14:23435859, замена Т/А, частота в популяциях (GnomAD) около 3%, в базе RUSeq отсутствует. Полиморфизм находится в консервативной части промотора, примерно за 200 нуклеотидов до старта транскрипции.

В гене *TNNI3* выявлено два SNP со значением Phred по CADD больше 10: rs3729711 (Phred=12,4) и rs11671293 (Phred=10,5). Первый из них — это замена С на А в позиции chr19:55156279, расположенная в экзоне 5 и представляющая собой синонимичный полиморфизм (p.Arg68Arg). Частота аллеля А в популяциях различного происхождения составляет около 4%. Следует отметить, что предикторы FATHMM-MKL и Mutation Taster оценивают этот вариант как «вредный» (damaging).

Второй вариант - rs11671293, встречающийся в популяциях с частотой от 20% (европейцы) до 65% (африканцы), представляет собой замену chr19:55157437 Т/С в интроне 1 гена, которая приводит к появлению нового CpG-сайта.

Эти два варианта не сцеплены друг с другом. Только один пациент с ГКМП являлся носителем обоих вариантов, в транс-положении, во всех других случаях у пациентов выявлен только один вариант из двух.

Вариант rs3729711 идентифицирован у пациентов с ГКМП (3 человека) и одного пациента с гипертрофией левого желудочка, вследствие артериальной гипертензии в гетерозиготном состоянии. Частота аллеля А в выборке ГКМП составила, таким образом, 4%, что соответствует популяционной частоте.

Вариант rs11671293 был зарегистрирован в гетерозиготном состоянии у 5 пациентов с ГЛЖ при АГ (частота аллеля С 19%) и у 14 пациентов с ГКМП, из которых 3 были гомозиготны по этому варианту (частота аллеля С составила 23,6%). Это также согласуется с оценками, полученными для европейских популяций.

Функциональная значимость данного полиморфизма подчеркивается данными о его роли в качестве eQTL для гена длинной некодирующей РНК *CTD-2587H24.5* в левом желудочке сердца, а также для гена *TNNI3* в скелетных мышцах [<https://gtexportal.org/>].

3.2.2.2 Ген *TNNT2*

В гене *TNNT2* с помощью инструментов CADD выявлено 10 вариантов с возможным функциональным эффектом, то есть со значением показателя Phred больше 10 (Таблица 8; Приложение В).

Из них 6 SNP были локализованы в интронах, 2 в экзонах (в том числе миссенс-замена p.Lys263Arg (rs3730238) и синонимичный вариант p.Ile116Ile (rs3729547), и два – в промоторе гена. Кроме того, в таблицу 8 включены четыре варианта, не отвечающих этому условию, то есть с показателем Phred меньше 10.

Первый – миссенс-вариант p.Ala38Val (rs200754249), который был выявлен у одного пациента с ГЛЖ при АГ.

Второй вариант – делеция 5 нуклеотидов в интроне 3 гена, вблизи точки ветвления сплайсинга – rs45533739 (CADD не рассчитывает вероятности для делеций и инсерций). Как было показано с помощью экспериментов *in vitro*, эта делеция может приводить к пропуску 4 экзона при сплайсинге мРНК [Komamura K. et al., 2004]. Кроме того, гомозиготный по делеции генотип был ассоциирован с параметрами гипертрофии миокарда при концентрической гипертрофии [Komamura K. et al., 2004], а также более часто встречался у пациентов с ГКМП по сравнению с контрольной группой [García-Castro M. et al., 2006].

Третий дополнительный полиморфизм, рассматриваемый нами в гаплотипе – это расположенный в интроне rs10920184, для которого ранее была показана GWAS ассоциация с параметрами ЭКГ, диагностически значимыми для гипертрофии миокарда [van der Harst P. et al., 2016]. Наконец, четвертый вариант - rs1892027 – согласно данным GWAS, связанный с морфологией трабекул сердца, аномалии которых часто выявляются при кардиомиопатиях [Meyer H.V. et al., 2020]. Частота аллелей С rs10920184 и С rs1892027 в популяции 62–64% и 72% соответственно (gnomAD, RUSeq).

Анализ структуры гаплотипов, образованных этими SNP в исследованных выборках пациентов, демонстрирует, что как у пациентов с ГКМП, так и у пациентов с ГЛЖ при АГ имеет место резкое преобладание одного гаплотипа, образованного не-референсными аллелями частых полиморфизмов rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739 и rs947485. В таблице эти варианты выделены жирным шрифтом. Следует отметить, что расстояние между крайними из этих SNP составляет около 14 тысяч п.о.

Таблица 8. Гаплотипы в гене *TNNT2*, образованные потенциально значимыми функциональными вариантами, у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Координаты chr1:	Референсный/альтернативный аллель		Локализация	Phred	Идентификатор в dbSNP	Гаплотип																			
						№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10	№11	№12	№13	№14	№15	№16	№17	№18	№19	№20
201361001	T	C	Инtron	12,43	rs10920181	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C	C	C	T	C	T	T	T
201361301	T	C	Экзон	23,5	rs3730238	T	T	T	T	C	T	T	T	T	T	T	T	C	C	T	C	T	T	T	T
201362423	C	T	Инtron	16,48	rs138604711	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C
201362426	T	G	Инtron	19,51	rs1104859	G	T	G	G	G	T	T	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
201362892	T	C	Инtron	0,044	rs1892027	C	T	C	C	C	T	T	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	T
201365254	G	A	Экзон	10,8	rs3729547	A	G	A	A	A	A	G	G	A	G	A	A	A	A	G	A	A	A	A	A
201368212	G	A	Экзон	5,59	rs200754249	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
201369768	T	C	Инtron	6,40	rs10920184	C	T	T	C	T	C	T	T	C	T	T	C	C	C	T	T	T	T	C	C
201371368	G	A	Инtron	11,79	rs4915240	A	G	G	A	G	A	G	G	A	G	G	A	A	A	G	G	G	A	A	A
201372048	AGAAG	- (D)	Инtron	-	rs45533739	D	I	D	D	D	D	D	I	D	I	I	D	D	D	I	D	D	D	D	D
201375914	C	T	Инtron	14,32	rs12568177	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
201376224	A	G	Инtron	10,25	rs947485	G	A	G	G	G	G	G	A	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G
201377801	G	A	промотор	12,51	нет	G	G	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
201377920	G	A	Промотор	15,18	rs45529540	G	G	G	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
Численность в выборке пациентов с ГКМП, 2n=72						35	19	1	2	1	1	1	1	0	0	1	0	3	1	1	1	1	2	1	0
Численность в выборке пациентов с ГЛЖ при АГ, 2n=26						15	4	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2

Примечание: Зеленым цветом выделены ячейки, содержащие информацию об альтернативном аллеле варианта, желтым цветом – варианты с частотой аллеля в популяции >50% (GnomAD - европейцы, RUSseq), курсивом – варианты, ассоциированные с морфологическими или функциональными параметрами сердца (по данным GWAS). Координаты вариантов даны по GRCh38/hg38 сборке генома человека.

Частота этого гаплотипа (гаплотип №1; Таблица 8) в исследованных нами выборках составляет не менее 50%, а если объединить его с гаплотипами, несущими дополнительные замены (№4, №12, №13, №14), то его частота составляет 57% в выборке с ГКМП и 65% в выборке с ГЛЖ при АГ.

Вторым по распространенности является гаплотип, образованный референсными аллелями указанных полиморфизмов (гаплотип №2; Таблица 8), частота которого (вместе с гаплотипом №10) составляет 26,3% в выборке ГКМП и 19% в выборке ГЛЖ при АГ (различия статистически не значимы). Все остальные гаплотипы, отличающиеся от первых двух одним или двумя вариантами, были зарегистрированы в единичных случаях, кроме гаплотипа №13, который встретился у трех пациентов с ГКМП.

Миссенс-вариант p.Lys263Arg (rs3730238), выявленный у четырех пациентов с ГКМП, чаще был сцеплен с деривативами гаплотипа №1 (это гаплотипы №5, №14, №16), а миссенс-вариант p.Ala38Val (rs200754249, гаплотип №10), наоборот, - с гаплотипом №2.

Мутация c.C862T (rs121964857, p.Arg288Cys) в гене *TNNT2* была идентифицирована у пациента с ГКМП с помощью массового параллельного секвенирования, в связи с этим невозможно точно определить гаплотип, сцепленный с ней. Однако чаще всего в генотипе у пациента встречались референсные аллели, входящие в гаплотип №2.

Итак, семь частых вариантов (rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739 и rs947485) в гене *TNNT2* образуют устойчивый гаплотип №1, преобладающий в выборках пациентов и, по-видимому, в популяции, если исходить из частот этих полиморфизмов в базах данных GnomAD и RUSeq. Второй устойчивый гаплотип отличается от него по всем семи вариантам. Переходные варианты между ними редки. Этот факт требует дальнейших исследований на популяционных выборках для подтверждения или исключения действия фактора отбора на формирование гаплотипов в данном гене.

Шесть вариантов, которые входят в состав гаплотипов №1 и №2, расположены в интронах гена, а один – в экзоне 10, представляя собой частый синонимичный вариант p.Ile116Ile (rs3729547), который ранее был ассоциирован с риском развития дилатационной кардиомиопатии в популяциях Китая: хань и казахов [Li X., et al., 2013; Li Y.D., et al., 2015].

Три интронных варианта - rs10920184 (интрон 5), rs1892027 и rs1104859 (оба интрон 12), входящих в состав двух распространенных у пациентов гаплотипов, были ассоциированы в отдельных работах GWAS с Корнельским вольтажным индексом – показателем, который рассчитывается на основе ЭКГ и используется для диагностики ГЛЖ, с морфологией трабекул сердца, аномалии которых часто выявляются при кардиомиопатиях, а также с параметрами ЭКГ [van der Harst P. et al., 2016; Meyer H.V. et al., 2020; Verweij N. et al., 2020; Young W.J. et al., 2023].

Дальнейший анализ локусов, идентифицированных в работе [van der Harst P. et al., 2016], показал, что в этом регионе расположен суперэнхансер, активность которого различается между контролем и пациентами с ГКМП [Hemerich D. et al., 2019]. Более того, все шесть интронных вариантов гаплотипов №1 и №2 являлись eQTL для гена *PKP1* в скелетных мышцах и sQTL для гена *TNNT2* в ушке правого предсердия [<https://gtexportal.org/>].

В этом же гаплотипе лежит делеция пяти нуклеотидов в полипиримидиновом тракте точки ветвления в интроне 3 (rs45533739), которая может приводить к пропуску экзона 4 в процессе сплайсинга и соответственно к увеличению в миокарде доли изоформы cTnT2 тропонина Т, которая, по некоторым данным, может быть связана с предрасположенностью к развитию гипертрофии миокарда в результате гемодинамического стресса [Komamura K. et al., 2004]. Можно заметить, что частота этой делеции в нашей выборке пациентов с ГКМП составила 65%, а в группе пациентов с ГЛЖ при АГ – 77%. Необходимы дальнейшие исследования для выявления роли гаплотипов гена *TNNT2* в подверженности гипертрофии левого желудочка при артериальной гипертензии.

Традиционным подходом к анализу гаплотипов является их определение исходя из генотипов, реализованное в программе Haploview [Barret J.C. et al., 2005]. Результаты анализа данных по гену *TNNT2* в выборках пациентов с ГКМП (n=36) и ГЛЖ при АГ (n=13) представлены на Рисунке 13.

Согласно расчетам, в этом гене есть один блок сцепления, охватывающий все анализируемые генетические варианты, кроме rs45529540 (в выборке пациентов с ГКМП). Устойчивое сочетание семи частых полиморфизмов в цис-положении, обнаруженное нами в результате анализа данных нанопорового секвенирования, также выявляется по результатам расчетов неравновесия по сцеплению (высокие значения D' для пар SNP 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12 на Рисунке 13).

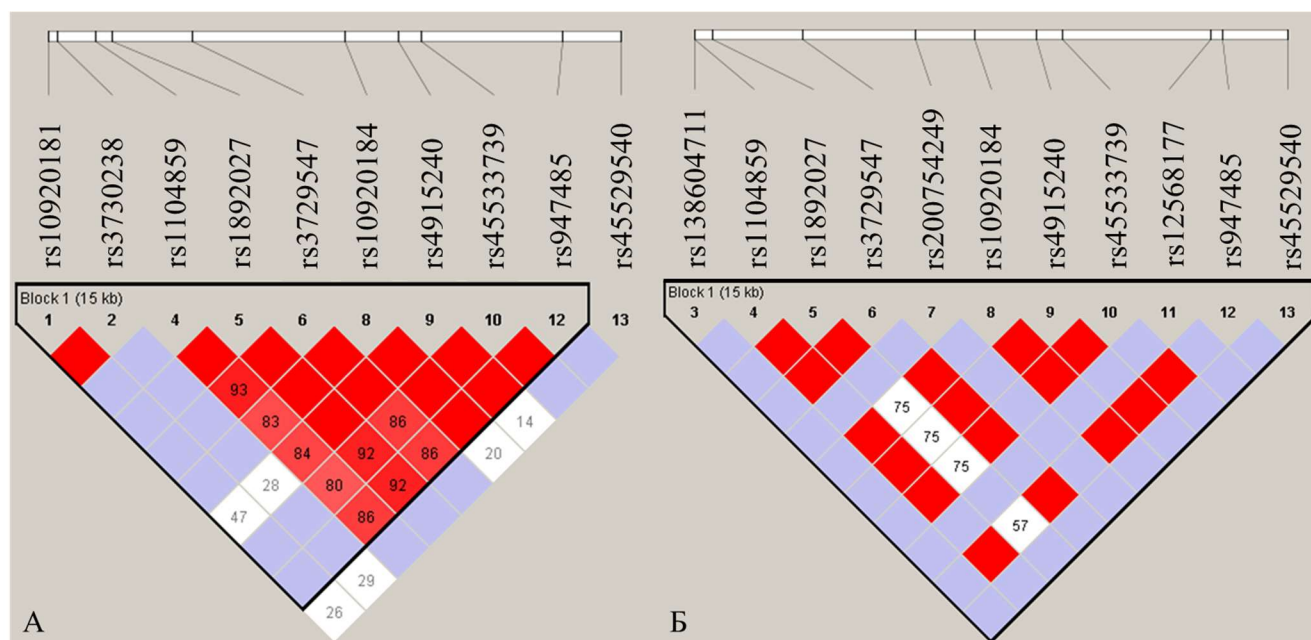


Рисунок 13. Неравновесие по сцеплению между генетическими вариантами в гене *TNNT2* в выборке пациентов с ГКМП (А), ГЛЖ при АГ (Б). В неподписанных квадратах $D'=1$ (100%). Сиреневым цветом обозначены пары генетических вариантов с $D'=1$ и низким значением r^2 . Анализ проведен для вариантов с частотой в группе более 2%.

Таким образом, у пациентов с ГКМП, а также сочетанием ГЛЖ при АГ, в результате анализа гаплотипов гена *TNNT2*, определенных с помощью длинных прочтений, нами выявлен частый гаплотип в гене *TNNT2*, образованный семью вариантами (rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739 и

rs947485), которые могут иметь функциональную значимость, влияя на сплайсинг данного гена в миокарде. Миссенс-вариант p.Ala38Val (rs200754249), выявленный у одного пациента с ГЛЖ при АГ, находится в транс-положении относительно этого гаплотипа. Миссенс-вариант p.Lys263Arg, идентифицированный у четырех пациентов с ГКМП, находится в цис-положении относительно этого гаплотипа.

3.2.2.3 Ген *TPM1*

В гене *TPM1* было выявлено 22 варианта со значениями Phred больше 10 (Приложение В). Кроме этого, в анализ были включены два варианта, имеющие значение Phred меньше 10 – rs6738 и rs8519, которые расположены в 3'UTR. Для rs6738 (15:63071702-C-T), значение Phred (CADD) составляет всего 0,57. Однако выявлена ассоциация этого полиморфизма с дилатационной кардиомиопатией (“С”, референсный и более редкий аллель, являлся аллелем риска) и с уровнем miR-21 в плазме крови (гомозиготы СС имели более низкий уровень данной микроРНК) [Yao Q. et al., 2019]. Вариант rs8519 (chr15:63071455-A-G) был сцеплен с rs6738.

Все 24 варианта в гене *TPM1* образуют в общей сложности 50 гаплотипов: 43 различных гаплотипа выявлены у 36 пациентов с ГКМП, и 15 гаплотипов – у 13 пациентов с ГЛЖ при АГ (Приложение Г).

Самым частым гаплотипом в обеих выборках является гаплотип №1 (12,5% у пациентов с ГКМП и 30,8% у пациентов с ГЛЖ при АГ), отличающийся от референсной последовательности по трем полиморфизмам: rs1071646, rs8519 и rs6738, популяционная частота которых, по данным проекта GnomAD, во всех популяциях мира превышает 60%. Остальные гаплотипы гена *TPM1* в изученных выборках – пациенты с ГКМП, ГЛЖ при АГ, встречаются значительно реже. Можно отметить гаплотип №12, соответствующий референсной последовательности, который был выявлен только у трех пациентов с ГКМП (4%), но не был зарегистрирован у пациентов с ГЛЖ при АГ.

Вариант rs1071646 (замена С на А в позиции chr15:63059641) является синонимичной заменой в третьей позиции кодона 151 (аланин). Несмотря на это, данная позиция является более эволюционно консервативной, чем стоит ожидать исходя из скорости мутаций, что и обуславливает значение Phred (CADD), равное 13,59.

Два других полиморфизма (rs6738 и rs8519) расположены в 3'-нетранслируемом регионе гена и находятся в сильном неравновесии по сцеплению как друг с другом, так и с rs1071646. У всех обследованных нами пациентов rs6738 полностью сцеплен с расположенным на 247 п.н. в 5' направлении rs8519 (15:63071455-A-G). Интересно, что для этих двух частых вариантов в изученных выборках наблюдается существенное отклонение частот генотипов от равновесия Харди-Вайнберга, с недостатком гетерозигот: при частоте аллеля 50% (в обоих случаях) во всей выборке выявлено всего три гетерозиготы (значение статистики хи-квадрат 37,7; уровень значимости $p < 10^{-6}$).

В работе [Yao Q. et al., 2019] распределение генотипов rs6738 в группе пациентов также отклонялось от ожидаемого при равновесии Харди-Вайнберга, тогда как в контрольной выборке это распределение соответствовало ожидаемому. Следует также отметить, что частота этого SNP (50%) в исследованных нами группах существенно ниже, чем в популяционных базах данных (от 58% у африканцев до 97% в Юго-Восточной Азии).

Согласно базе данных GTEx, все три полиморфизма rs1071646, rs6738 и rs8519, входящие в гаплотип №1, являются eQTL для генов *TPM1* и *LACTB* в тканях сердца, скелетных мышцах и сосудах [<https://gtexportal.org/>].

LACTB представляет собой растворимый белок, локализующийся между внешней и внутренней мембранами митохондрий. Он является супрессором опухоли, модулируя метаболизм липидов [Keckesova Z. et al., 2017]. Следует отметить, что наиболее высокая экспрессия данного гена показана в скелетных мышцах и сердце. Однако его роль в развитии кардиомиопатии не ясна.

Что касается *TPM1*, то чаще всего, в исследованиях анализируется функциональная роль его редких патогенных вариантов, расположенных в кодирующих регионах или канонических сайтах сплайсинга, а не частых полиморфизмах. Поскольку в работе Yao Q. et al. (2019) отмечается, что есть ассоциация между частым полиморфизмом rs6738 и уровнем miR-21 в плазме крови пациентов с дилатационной кардиомиопатией, мы провели сравнительный анализ «сидовых» регионов микроРНК и нуклеотидной последовательности 3'UTR гена *TPM1*, содержащей генетические варианты, которые входят в гаплотипы пациентов нашей выборки, с помощью программы TargetScan_8.0 (Рисунок 14) [https://www.targetscan.org/vert_80/].

В результате выявлено, что вариант rs8519, входящий в гаплотип №1, расположен близко к консервативным сайтам «сидового» региона miR-183-5p.2, miR-96-5p и miR-1271-5p, а другой полиморфизм 3'UTR rs707602 – miR-29-3p (Рисунок 14). Кроме того, другие SNP анализируемого локуса (rs6738 и rs7178040) потенциально могут нарушать связывание широкого спектра микроРНК и мРНК *TPM1*, согласно базе данных miRNASNP-v3 [Liu C.-J. et al., 2021; <http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP/#!/>].

Исходя из информации источника miRTarBase [Huang H.-Y. et al., 2022; https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php], у человека *TPM1* является экспериментально валидированной мишенью с сильной степенью доказательности лишь для miR-21-5p и miR-10b-5p. Однако у *Rattus norvegicus* показана связь между *TPM1* и miR-29c-3p.

С другой стороны, в отдельных публикациях установлено, что *TPM1* является мишенью для miR-183, miR-96 и miR-29 при некоторых типах рака [Kwon J.J. et al., 2018; Ge T. et al., 2020; Li et al., 2023].

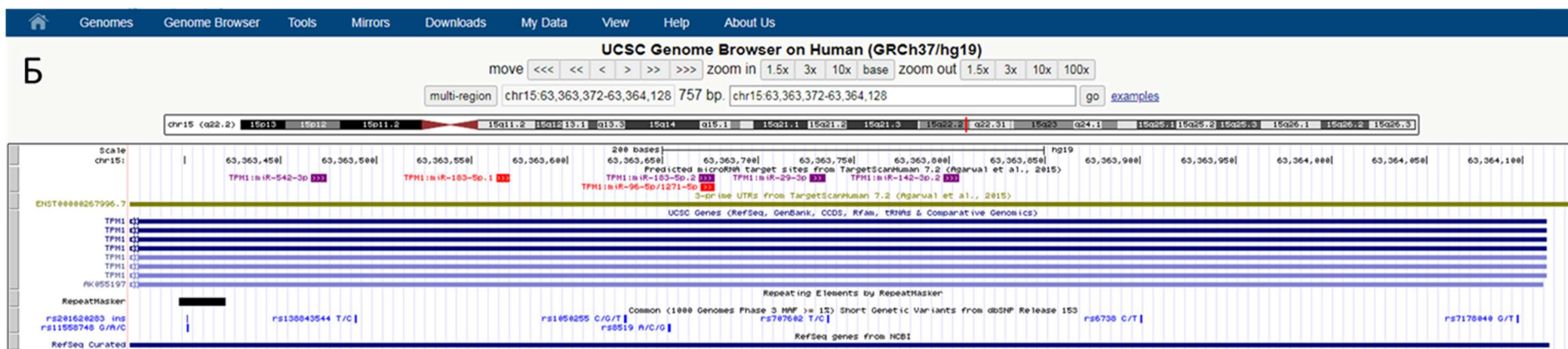
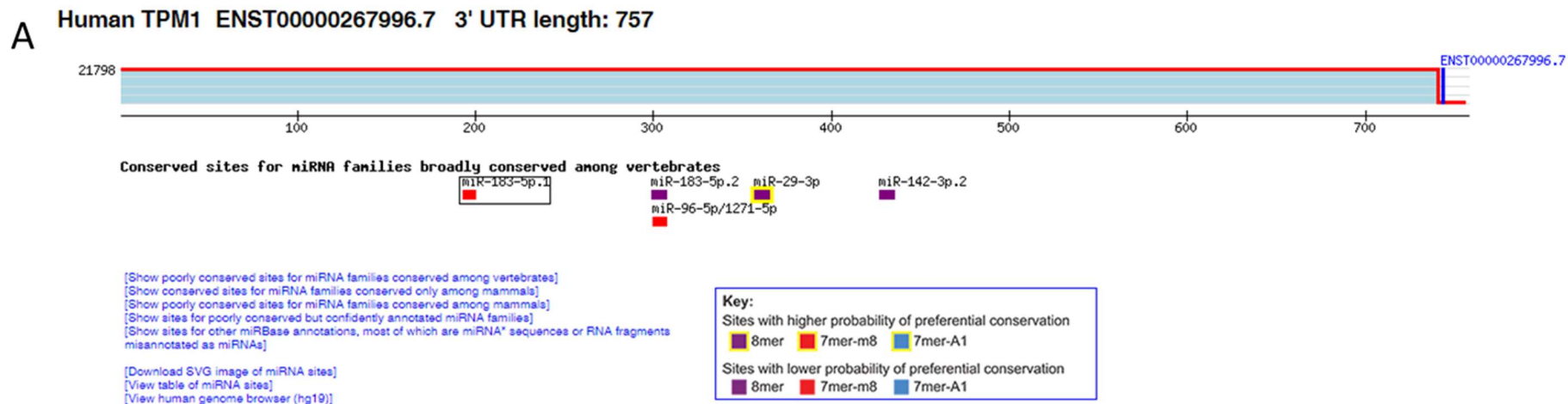


Рисунок 14. Сопоставление (А) и визуализация (Б) в геномном браузере UCSC Genome Browser on Human (GRCh37/hg19) консервативных сайтов «сидового» региона микроРНК и 3'UTR основного транскрипта гена *TPM1* (ENST00000267996.7).

Также miR-29с является ключевой микроРНК, связанной с фиброзом почек и полости рта, подавляя экспрессию *TPM1* и ингибируя путь TGF- β 1/Wnt/ β -катенин [Huang H. et al., 2020; Yang P.Y. et al., 2022]. Более того, изменение экспрессии miR-183, miR-96 и особенно семейства miR-29 показано в сыворотке крови пациентов при гипертрофической кардиомиопатии, в том числе с фиброзом миокарда [Chiti E. et al., 2021]. Таким образом, предположение о том, что rs8519, rs707602, rs6738 и rs7178040, расположенные в области 3'UTR гена *TPM1*, могут регулировать его экспрессию в кардиомиоцитах опосредованно через широкий спектр микроРНК, а также их связь с патологией миокарда нуждается в экспериментальной проверке.

Поскольку SNP в 3'UTR регионе генов играют важную роль в их экспрессии через регуляцию стабильности мРНК, нами был проведен биоинформатический анализ фолдинга *TPM1* в случае полиморфизма rs8519, rs707602, rs6738 и rs7178040 с использованием веб-сервера RNAfold (Рисунок 15) [<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>].

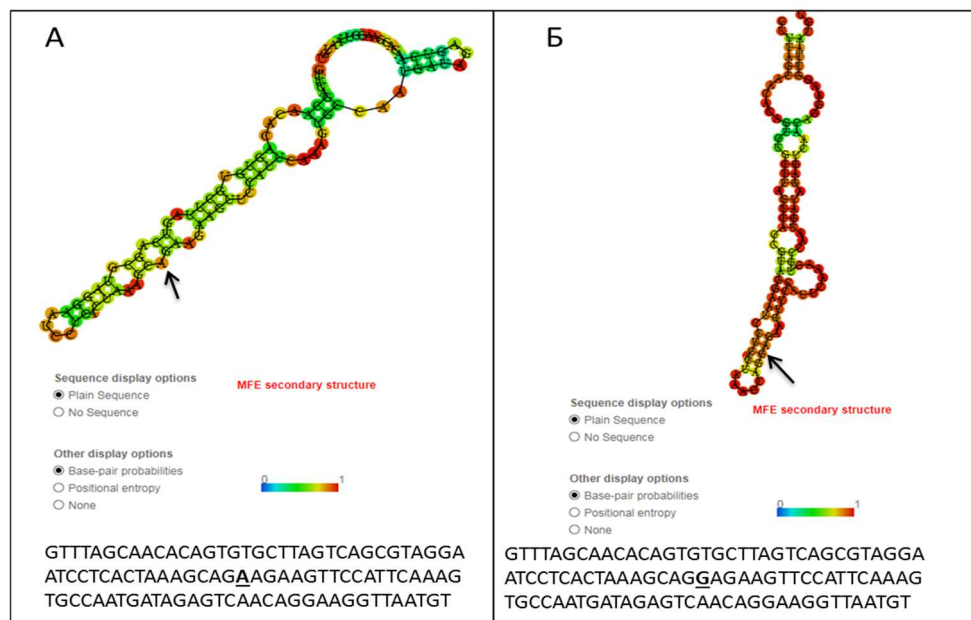


Рисунок 15. Связь rs8519 и вторичной структуры мРНК *TPM1*. Стрелкой указана позиция варианта. Минимальная свободная энергия (ΔG) для аллеля А составляет -12.50 ккал/моль (А) и для аллеля G -15.30 ккал/моль (Б) при использовании программы RNAfold Web Server.

Хорошо известно, что РНК-связывающие белки специфически связываются с консенсусными областями в последовательности 3'UTR, чтобы регулировать стабильность мРНК и ее эффективность трансляции в белок. Анализ сайтов РНК-связывающих белков в области анализируемых вариантов 3'UTR основного транскрипта гена *TPM1*, выполненный с помощью программы RBPmap [<http://rbpmap.technion.ac.il/index.html>] и с визуализацией результатов в UCSC Genome Browser, представлен на Рисунке 16.

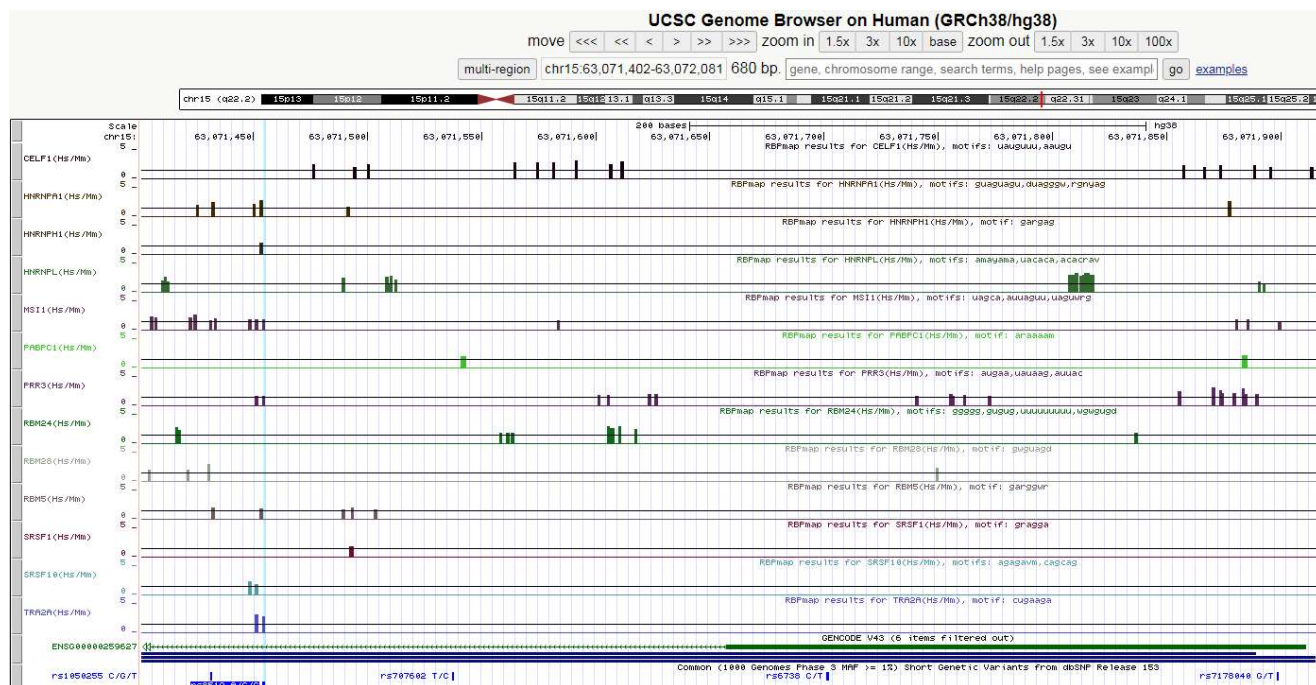


Рисунок 16. Визуализация результатов биоинформатического анализа сайтов РНК-связывающих белков в области 3'UTR основного транскрипта гена *TPM1* в геномном браузере UCSC Genome Browser on Human (GRCh38/hg38). Внизу картинки расположены rs8519, rs707602, rs6738 и rs7178040, а РНК-связывающие белки – слева.

Данный анализ подтверждает «насыщенность» 3'UTR *TPM1* мотивами большого спектра РНК-связывающих белков (MSI1, PRR3, TRA2A, HNRNPA1, HNRNPH1, RBM5, RBM28, SRSF10, SRSF1, CELF1, PABPC1, HNRNPL, RBM24 и др.), включая те, которые связаны с гипертрофией миокарда (CELF1, PABPC1), а также с развитием сердечной недостаточности по данным литературы (HNRNPL, RBM24, CELF1) (Рисунок 16) [Gray G.A., Gray N.K., 2017; de Bruin R.G. et al., 2017; Hu X. et al., 2021; D'Antonio M. et al., 2022].

Более того, вариант rs8519 расположен непосредственно в области сайтов связывания MSI1, PRR3 и TRA2A. Биоинформатический анализ показал, что замена rs8519 A>G приводит к потере сайтов связывания для MSI1 и PRR3, но к появлению сайтов для таких белков как HNRNPH1, RBM28 и SRSF10 в 3'UTR *TPM1*.

Из всех РНК-связывающих белков наиболее изученным при кардиомиопатиях является RBM20, который формирует разнообразие транскриптома в клетках сердца, а редкие варианты в его гене объясняют до 6% семейных случаев дилатационной кардиомиопатии [Koelemen J. et al., 2021]. Следует отметить, что RBM20 регулирует процесс сплайсинга многих генов мишеней, включая *TPM1* [Guo W. et al., 2012]. Таким образом, необходимо детальное изучение роли широкого спектра РНК-связывающих белков в регуляции альтернативного сплайсинга гена *TPM1* в кардиомиоцитах, принимая во внимание тот факт, что варианты rs1071646 (экзон 4), rs8042050 (интрон 8), rs11636549 (интрон 9) и 3'UTR области (rs8519, rs707602, rs6738 и rs7178040) являются sQTL для данного гена в левом желудочке и ушке правого предсердия [<https://gtexportal.org/>].

Анализ структуры гаплотипов *TPM1* у пациентов позволил выявить два блока сцепленных друг с другом частых (более 10%) SNP. Первый состоит из 5 полиморфизмов (rs8026502, rs57645645, rs73431508, rs4075047 и rs111470259). Все они располагаются в области, кодирующей антисмысловую РНК *asTPM1* во втором интроне гена (Рисунок 17).

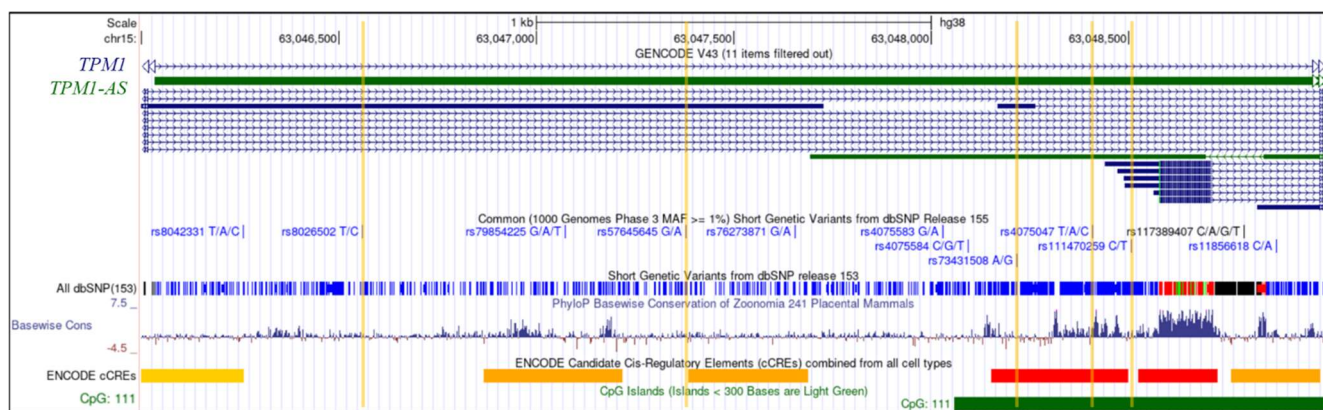


Рисунок 17. Локализация сцепленных между собой полиморфизмов (rs8026502, rs57645645, rs73431508, rs4075047 и rs111470259) во втором интроне гена *TPM1* визуализированная в UCSC Genome Browser [<https://genome.ucsc.edu/>].

В этой области находится альтернативный промотор *TPM1*, CpG-островок, энхансерные последовательности. Кроме того, согласно данным по аллель-специфичному связыванию транскрипционных факторов (онлайн-ресурс ADASTR), три из этих SNP (rs73431508, rs4075047 и rs111470259) влияют на связывание нескольких факторов транскрипции - JUN, BRCA2, ANDR, BC11B, STAT1, CTCF, STAG1, RAD21 и SSXT в различных культурах клеток (Приложение В). В частности, показано, что Stat1 ингибирует гипертрофию миокарда у мыши путем подавления активности генов гипертрофии и фиброза, но стимуляции деления митохондрий и усиления их функции в кардиомиоцитах [Zhen C. et al., 2021].

Следует отметить, что оценки частоты этих полиморфизмов в исследованных выборках значительно выше по сравнению с их частотой в европейской, в том числе популяции в РФ (Приложение В). Однако статистические тесты не были проведены в связи с большой разностью объема выборок (популяционные оценки получены на нескольких тысячах человек).

Второй «блок сцепления» образован полиморфизмами rs11636549, rs707602 и rs7178040, которые расположены в 3'-некодирующем регионе гена *TPM1*, так же, как и rs8519 и rs6738, однако альтернативные аллели для rs11636549, rs707602 и

rs7178040, с одной стороны, и rs8519 вместе с rs6738, с другой стороны, находятся на разных гаплотипах.

Самые высокие оценки Phred в гене *TPM1* имеют полиморфизмы rs35829897 (18,82) и rs62013181 (18,96). Первый из них был отмечен у одного пациента с ГЛЖ при АГ, а также у двух пациентов с ГКМП, на разных гаплотипах. Второй был выявлен только у пациентов с ГКМП на одном гаплотипе. Обе этих замены ведут к появлению новых CpG-сайтов, которые могут участвовать в эпигенетической регуляции экспрессии гена *TPM1*.

В частности, полиморфизм rs62013181 расположен в интроне гена между альтернативными экзонами 2a и 2b (Рисунок 18). На рисунке видно, что последовательность этого интрона более консервативна, чем последовательности соседних интронов. Также в этой области расположены энхансерные последовательности. Включение в белок экзона 2b характерно для α -изоформы тропомиозина, а включение экзона 2a — для κ -изоформы [Denz C.R. et al., 2004]. Было показано, что повышенная экспрессия κ -изоформы в миокарде приводит к дилатационной кардиомиопатии [Rajan S. et al., 2010].

Ген антисмысловой РНК *TPM1-AS* расположен в области интрона 2 гена *TPM1* и считывается, соответственно, с обратной цепи относительно мРНК тропомиозина. Показано, что эта антисмысловая РНК взаимодействует с РНК-связывающим белком RBM4, который участвует в регуляции альтернативного сплайсинга, способствуя включению в мРНК экзона 2a. Связывание *asTPM1* РНК с RBM4 препятствует его связыванию с пре-мРНК тропомиозина. Соответственно, сверхэкспрессия *TPM1-AS*, так же, как и нокдаун *RBM4*, ведет к увеличению экспрессии α -изоформы [Huang G.W. et al., 2017]. Если сцепленные друг с другом SNP в области гена *TPM1-AS* изменяют силу связи с этим белком, то это также может влиять на соотношение изоформ тропомиозина. Кроме того, основным эффектом антисмысловых длинных некодирующих РНК является подавление экспрессии гена-мишени: *TPM1-AS* кодируется в том числе участком, комплементарным экзону 1 гена тропомиозина.

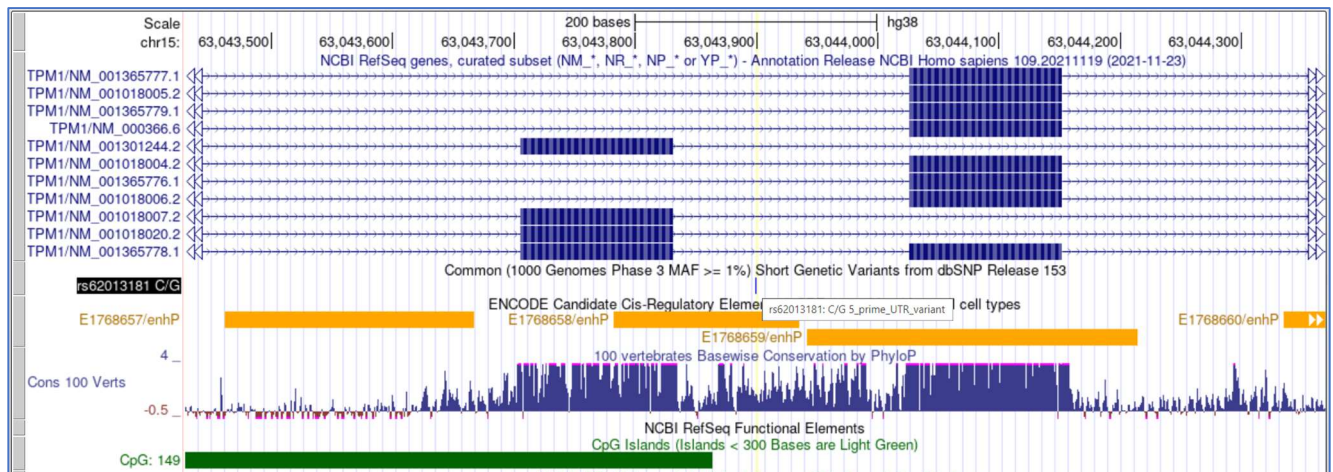


Рисунок 18. Локализация rs62013181 в интроне 1 гена *TPM1* визуализированная в UCSC Genome Browser [<https://genome.ucsc.edu/>].

Анализ неравновесия по сцеплению для полиморфизмов в гене *TPM1* с помощью программы Haploview выявил четыре блока сцепления у пациентов с ГКМП (Рисунок 19А). Первый включает два полиморфизма с самым высоким значением PHRED, в промоторе (rs35829897) и в первом интроне (rs62013181), и фактически не сцеплен с полиморфизмами в остальной части гена. Более того, редкие аллели этих двух SNP также не сцеплены друг с другом, что совпадает с результатами прямого определения гаплотипов с помощью нанопорового секвенирования (редкие аллели rs35829897 и rs62013181 находятся на разных гаплотипах).

Второй блок сцепления включает SNP во втором интроне гена (*TPM1-AS* РНК) с высокими показателями D' , что также было установлено с помощью нанопорового секвенирования (см. выше). Третий блок содержит три SNP, и четвертый – 8 SNP в последних экзонах гена и в 3'-нетранслируемой области, в том числе rs8519 (16) и rs6738 (18) (Рисунок 19А).

У пациентов с сочетанием ГЛЖ при АГ выявлено два блока сцепления полиморфизмов в гене *TPM1* с помощью программы Haploview (Рисунок 19Б). Однако генетические варианты (3–7) в гене антисмысловой РНК и (15–19) в 3'-нетранслируемом регионе также расположены в разных гапблоках, как у пациентов с ГКМП.

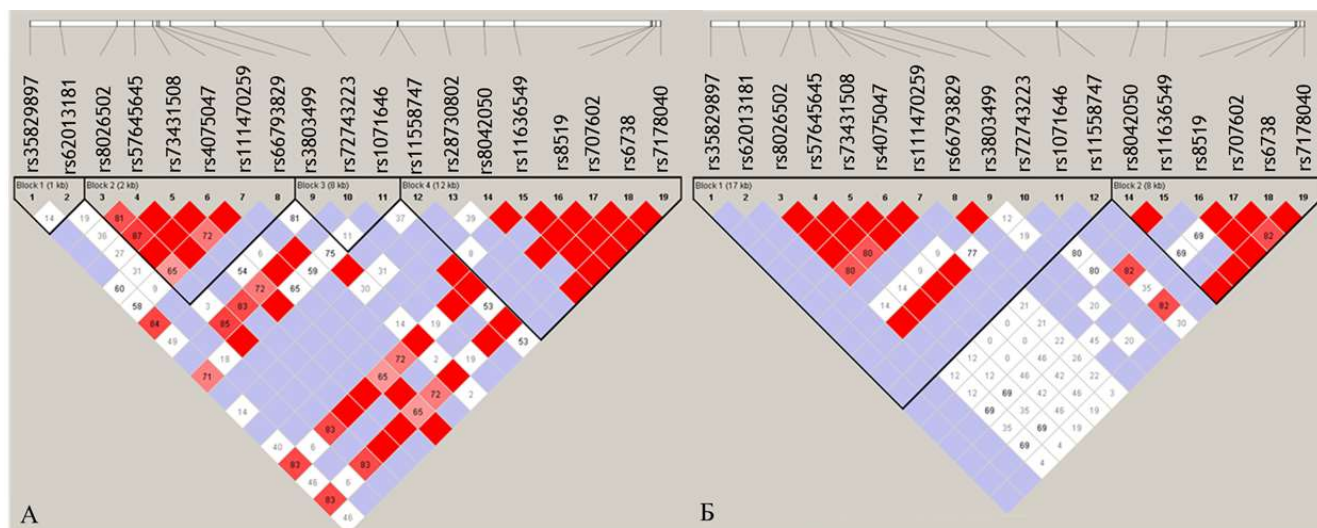


Рисунок 19. Неравновесие по сцеплению между SNP в гене *TPM1* в выборке пациентов с ГКМП (А), ГЛЖ при АГ (Б). В неподписанных квадратах $D'=1$ (100%). Сиреневым цветом обозначены пары генетических вариантов с $D'=1$ и низким значением r^2 . Анализ проведен для вариантов с частотой в группе более 2%.

Таким образом, анализ структуры неравновесия по сцеплению и частоты встречаемости гаплотипов в гене *TPM1* у пациентов с ГКМП, а также сочетанием ГЛЖ при АГ, показывает, что в регуляторных участках гена, в том числе в гене антисмысловой РНК и в 3'-нетранслируемом регионе, существуют устойчивые гаплотипы, образованные аллелями нескольких SNP с вероятным функциональным значением.

3.3 Сравнение технологий прямого мономолекулярного секвенирования (Oxford Nanopore Technologies) и массового параллельного секвенирования (Illumina) генов саркомерных белков в образцах пациентов с гипертрофической кардиомиопатией

Поскольку в анализируемых выборках использовались две технологии для секвенирования нуклеотидной последовательности пяти генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TPM1*, *TNNT2*, и *TNNI3*) – прямое мономолекулярное секвенирование (Oxford Nanopore Technologies) и массовое параллельное секвенирование (Illumina), мы провели сравнение качества секвенирования одних

и тех же продуктов ПЦР, полученных от 4 пациентов с ГКМП, с помощью обоих методов (Таблица 9).

Таблица 9. Показатели качества секвенирования пяти генов саркомерных белков в четырех образцах ДНК пациентов с ГКМП с использованием технологий Oxford Nanopore Technologies и Illumina

Параметр	Oxford Nanopore Technologies /Illumina			
	Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 4
Средняя оценка качества выравнивания прочтений	59,77/59,03	59,73/58,91	59,73/58,89	59,81/58,83
Средняя глубина прочтения	3568,7/277,4	3205,6/284,9	3908,2/347,01	4961,2/292,3
Общая частота ошибки секвенирования, %	6,9/1,14	6,92/1,23	6,91/1,24	6,86/1,35
Количество инсерций	3830262/3468	3429705/3464	4150256/3980	5300210/3802
Прочтения, как минимум, с одной инсерцией, %	84,93/0,65	83,44/0,54	87,6/0,68	85,61/0,85
Количество делеций	6608331/7444	5932133/6932	7066882/8140	9173356/7264
Прочтения, как минимум, с одной делецией, %	85,24/1,39	83,7/1,08	87,89/1,39	85,82/1,64
GC-состав, %	52,12/52,19	51,87/52,1	51,42/51,69	51,28/51,7

Общая длина ампликонов пяти генов саркомерных белков была 124422 п.о. Однако нам не удалось провести ПЦР области с 6-го по 12-й экзоны гена *MYBPC3*, протяженностью около 3500 п.о. и GC составом >70%.

При секвенировании Oxford Nanopore Technologies в среднем длина прочтения составила 3560 п.о., а глубина – 3900х. Глубина прочтения при секвенировании Illumina была в среднем 300х (Таблица 9).

В результате сравнения показателей качества секвенирования четырех образцов ДНК для двух методов обнаружено, что для прямого мономолекулярного секвенирования характерна более высокая частота ошибок секвенирования (6,86–6,92%), чем для технологии Illumina (1,14–1,35%; Таблица 9). Кроме того, секвенирование Oxford Nanopore Technologies выявило гораздо большее

количество коротких делеций и инсерций по сравнению с секвенированием Illumina (Таблица 9).

Различия кардинальны: среди 85,5% прочтений, полученных при секвенировании Oxford Nanopore Technologies, обнаружена, как минимум, одна инсерция (аналогично 85% прочтений имеют, как минимум, одну делецию). Аналогичные показатели для метода Illumina составили 0,7% и 1,4% соответственно. Даже после поправки на среднюю длину прочтения (3560 п.н. для Oxford Nanopore Technologies и 150 п.н. для Illumina) в данных прямого мономолекулярного секвенирования по-прежнему обнаруживается в 5 раз больше инсерций и в 2,5 раза больше делеций в пересчете на одно прочтение.

Средняя оценка качества выравнивания прочтений была одинакова для обоих методов (Таблица 9). Различия в глубине прочтения обусловлены разницей в емкости ячеек и присутствием других образцов при запуске.

В таблице 10 представлено сравнительное описание идентифицированных однонуклеотидных вариантов (SNV), которые представляют собой отличия от референсной последовательности каждого гена. В большинстве случаев SNV, идентифицированные в результате прямого мономолекулярного секвенирования, совпадали с SNV, выявленными технологией Illumina. Тем не менее, были некоторые несоответствия, и наибольшее число различий обнаружено среди гомополимерных последовательностей и областей, содержащих tandemные повторы.

Известно, что при превышении определенного порога принимаемый сигнал искажается, что ограничивает использование технологии Oxford Nanopore Technologies для гомополимеров с более чем четырьмя идентичными основаниями и снижает точность секвенирования [Rang, F.J. et al., 2018]. Кроме того, высокий процент ошибок секвенирования (вместе с дополнительными ошибками, вносимыми Taq-полимеразой в ПЦР длинных фрагментов), по крайней мере, в ячейке FLO-MIN106D, приводит к выявлению большого количества ложноположительных вариантов, каждый из которых должен быть проверен

секвенированием по Сэнгеру. Эта проблема приводит к увеличению времени и стоимости молекулярно-генетического анализа.

Таблица 10. Количество SNV, идентифицированных в пяти генах саркомерных белков в четырех образцах ДНК пациентов с ГКМП, с использованием технологий Oxford Nanopore Technologies и Illumina

SNV	Гены саркомерных белков				
	<i>MYBPC3</i>	<i>MYH7</i>	<i>TPM1</i>	<i>TNNT2</i>	<i>TNNI3</i>
	Oxford Nanopore /Illumina	Oxford Nanopore /Illumina	Oxford Nanopore /Illumina	Oxford Nanopore /Illumina	Oxford Nanopore /Illumina
Всего	31/35	28/26	99/100	60/58	13/12
В экзонах:	3/3	3/3	1/1	2/2	0/0
- синонимичные	2/2	2/2	1/1	1/1	0/0
- миссенс	0/0	0/0	0/0	1/1	0/0
- нонсенс	1/1	0/0	0/0	0/0	0/0
Сплайсинг	0/0	1/1	0/0	0/0	0/0
В интронах	26/30	23/21	78/80	56/54	11/11
3'UTR	2/2	2/2	20/19	2/2	2/1

С другой стороны, различие между методами Oxford Nanopore Technologies и Illumina в количестве идентифицированных однонуклеотидных замен может быть связано с пока еще несовершенными алгоритмами биоинформатической обработки данных мономолекулярного секвенирования.

При оценке SNV по степени их патогенности, только у одного из четырех пациентов с ГКМП был идентифицирован патогенный вариант с.3697C>T (p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* (подробное клиническое описание этого случая приведено в отдельном разделе главы «Результаты и Обсуждение»).

Следует заметить, что необходимо проявлять осторожность при идентификации генотипов в случае использования технологии мономолекулярного секвенирования Oxford Nanopore Technologies. Поскольку выявленный вариант с.3697C>T (p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3*, исходя из данных Oxford Nanopore Technologies, был идентифицирован как гомозиготный, тогда как

Illumina идентифицировала его как гетерозиготный. При этом число прочтений, содержащих альтернативный аллель, составило 80% для технологии Oxford Nanopore Technologies, а для Illumina – 87% (Рисунок 20А). Секвенирование по Сэнгеру подтвердило гетерозиготное носительство варианта (Рисунок 20Б).

Такая оценка генотипа может быть объяснена тем, что, поскольку качество мономолекулярного секвенирования не идеально, биоинформатический алгоритм определения генотипа по умолчанию определяет «сомнительные» генотипы как гомозиготные. Кроме того, такое кардинальное различие в числе прочтений аллелей (для обоих методов) может быть вызвано присутствием других однонуклеотидных полиморфизмов в зоне отжига праймеров в гаплотипе с референсным аллелем, что приведет либо к неравномерному отжигу праймеров при ПЦР и частичному выпадению аллелей, либо к контекст-зависимому снижению качества секвенирования, выравнивания и идентификации нуклеотидов [Shestak A.G. et al., 2021].

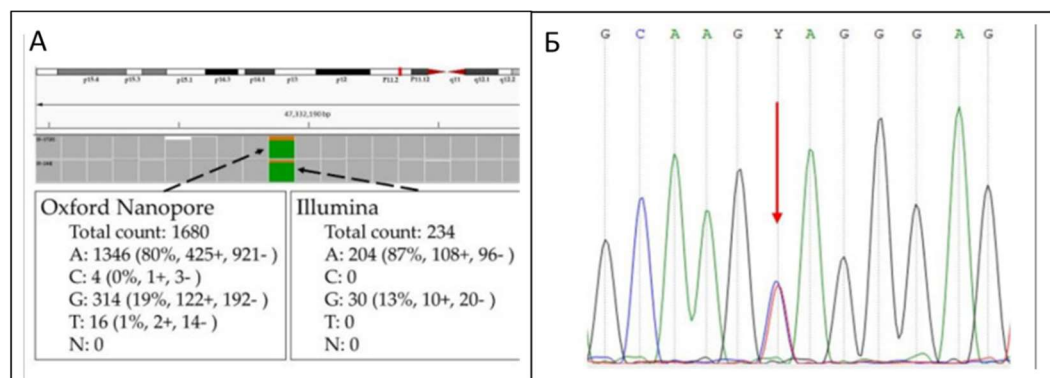


Рисунок 20. Визуализация данных секвенирования варианта с.3697C>T (p.Gln1233Ter) в гене *MYBP3* у пациента с ГКМП с использованием технологий Oxford Nanopore Technologies и Illumina (А) и секвенирования по Сэнгеру (Б).

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что для рутинной молекулярно-генетической диагностики метод массового параллельного секвенирования по-прежнему остается основным. Однако в случае повышения точности секвенирования и усовершенствования алгоритмов биоинформатического анализа технология нанопорового секвенирования имеет

большие перспективы для диагностики наследственных заболеваний, особенно при необходимости фазирования генетических вариантов и прямого определения гаплотипов у индивида, не зная об их наследовании от родителей. Описание такого примера приведено в следующем подразделе данной главы.

3.4 Определение цис-положения кандидатных вариантов в гене *MYH7* у пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии

При проведении молекулярно-генетической диагностики у некоторых пациентов с ГКМП выявляют более чем один вариант III–V класса патогенности. В случаях, когда такие варианты идентифицированы в одном гене, возможны две ситуации: (1) варианты расположены на одной хромосоме, то есть на одном гаплотипе, в *цис*-положении; (2) варианты расположены в разных хромосомах, т.е. на разных гаплотипах, в *транс*-положении. Гетерозиготность по двум разным мутантным аллелям гена (на разных гаплотипах) у индивида называют еще компаунд-гетерозиготным состоянием. С точки зрения прогноза течения заболевания вторая ситуация (*транс*-положение) всегда более опасна, так как у пациента нет «здорового» аллеля для производства полноценного белка. Пациенты с двумя мутациями в *транс*-положении имеют более высокие риски внезапной сердечной смерти (а значит, предполагается более агрессивная антиаритмическая терапия) и показания к установке имплантируемого кардиовертер-дефибриллятора. Кроме того, знание о взаимном расположении патогенных вариантов на хромосомах важно с точки зрения планирования семьи и деторождения: необходимо знать, каков риск наследования заболевания ребенком: 50% (при *цис*-положении) или 100%, но в более мягкой форме (при *транс*-положении).

Цис-/–*транс*-положение генетических вариантов легко определить, если для молекулярно-генетической диагностики доступен биологический материал родителей пациента. В случае *цис*-положения оба варианта должны быть унаследованы от одного родителя, в случае *транс*-положения – от разных. Если же

родственники недоступны или если один из вариантов появился у пробанда в результате мутации *de novo*, то фазирование аллелей требует проведения дополнительных исследований. Секвенирование длинных фрагментов ДНК позволяет напрямую определить гаплотипы, образованные вариантами исследованных генов.

Относительно высокая частота двух и более патогенных вариантов в генах саркомерных белков (7,2–9,5%) выявлена у пациентов с ГКМП в популяции Китая по сравнению с целым рядом европейских популяций (3–6%) [Zou Y. et al., 2013; Wang J. et al., 2014]. Хорошо известно, что наличие нескольких патогенных вариантов в генах саркомерных белков связано с существенной степенью увеличения толщины стенки левого желудочка в более молодом возрасте, большим риском развития сердечной недостаточности и внезапной сердечной смерти [Maron B.J. et al., 2012; Wang J. et al., 2014; Lopes L.R. et al., 2015; Nakashima Y. et al., 2020]. В маленьких по размеру выборках, где сконцентрированы пациенты с тяжелым течением ГКМП на последних стадиях заболевания, также отмечается увеличение частоты выявления нескольких патогенных вариантов в генах саркомерных белков более 10% [Garcia-Pavia P. et al., 2011]. В нашем исследовании таких пациентов, которые были бы носителями нескольких клинически значимых вариантов в генах *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*, не обнаружено.

Однако пациент, который имел два таких варианта (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)) в гене *MYH7*, выявлен в результате молекулярно-генетической диагностики ГКМП в лаборатории медицинской генетики ФГБНУ «РНЦХ им. академика Б.В. Петровского» (рук. лаб. – д.м.н. Заклязьминская Е.В.).

Из анамнеза заболевания известно, что пробанд (женщина) обратилась за медико-генетическим консультированием в возрасте 33 лет. Вплоть до 30 лет она не знала о своем заболевании, хотя о «шумах» в сердце педиатр сообщал с детства. Ранее пациентка занималась спортом (гандбол). У ее отца была выявлена

сердечная недостаточность, но диагноз не был уточнен, поскольку он умер внезапно в возрасте 57 лет. Брат отца также умер в возрасте 56–57 лет, с признаками сердечной недостаточности и также без точного диагноза. Старший брат пациентки умер внезапно в возрасте 37 лет. Его посмертный диагноз был ГКМП.

У пробанда признаки сердечной недостаточности резко проявились в возрасте 30–31 года после перенесенной ею пневмонии и после смерти брата. В результате обследования был поставлен диагноз: гипертрофическая кардиомиопатия, семейная форма, без обструкции ВЛЖ. Кроме того, у нее выявлены нарушения ритма сердца: атриовентрикулярная блокада 1 степени, блокада левой ножки пучка Гиса, пароксизм желудочковой тахикардии (с реанимацией). В связи с чем, пациенту выполнена имплантация двухкамерного кардиовертера-дефибриллятора. После перенесенной пневмонии также была диагностирована легочная гипертензия (систолическое давление в легочной артерии 50 мм рт. ст.), которая была успешно скорректирована оперативным лечением.

Оба генетических варианта (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)), идентифицированных у пациента с ГКМП, представляли собой миссенс-замены. Варианты расположены в 31м и 27м экзонах гена *MYH7* соответственно на расстоянии 2,4 Кб друг от друга (Рисунок 21).

Первый вариант – с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) классифицируется как вероятно патогенный по ACMG-классификации, а также большинством шкал предикции патогенности, реализованных в он-лайн инструменте Varsome. Он отсутствует в популяционной базе данных GnomAD, а согласно RUSeq, его частота – 0,0001. Описание данного варианта есть в ClinVar (ID: 43004), а также в отдельных публикациях у пациентов с ГКМП [Bortot B, et al., 2011; Wang J. et al., 2014; Lopes L.R. et al., 2015; Nakashima Y. et al., 2020], а также у индивидов с внезапной сердечной смертью [Lahrouchi N. et al., 2017].

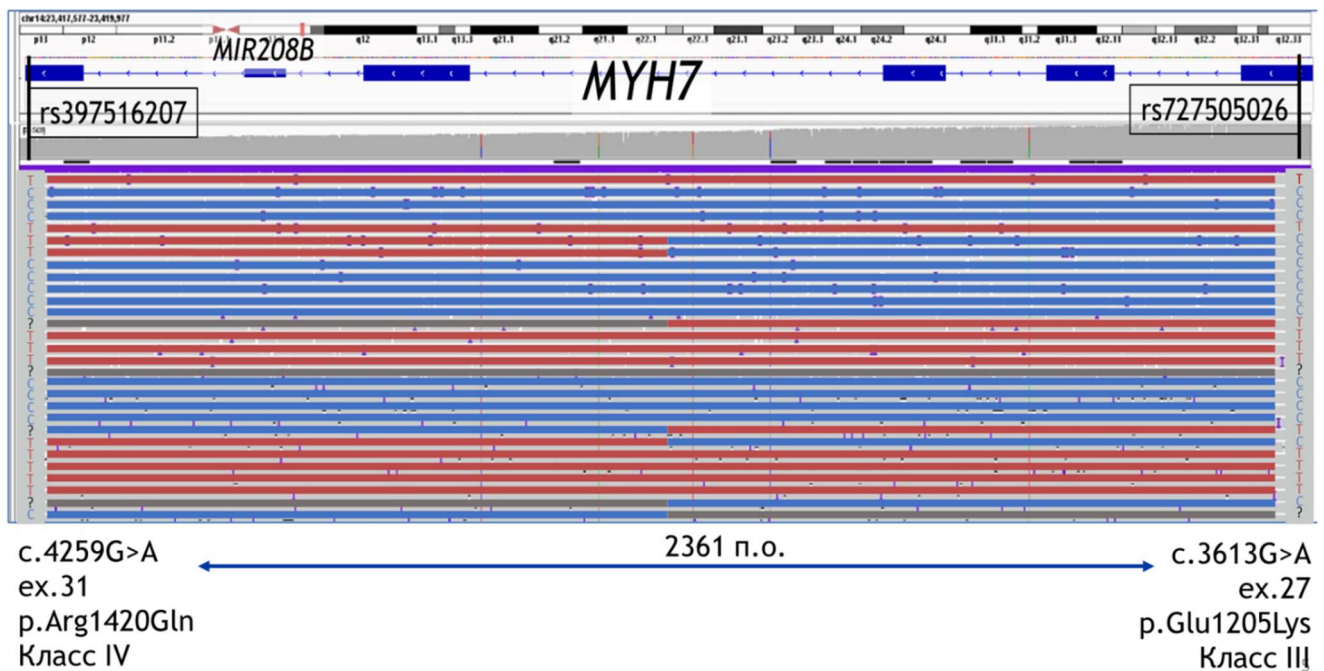


Рисунок 21. Фазируемость двух вариантов (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)) в гене *MYH7* у пациента с семейной формой ГКМП с помощью мономолекулярного секвенирования.

Второй вариант – с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys) относится к VUS (ACMG, Varsome). Его частота в GnomAD составляет 0,000004. Часть записей (4) в ClinVar (ID: 179656) реферируют rs727505026 как VUS, а одна – вероятно патогенный. Однако большинство шкал предикции относят данный вариант к «вредным». В публикациях замена p.Glu1205Lys выявлена у пациентов с ГКМП [Waldmüller S. et al., 2008; Berge K.E. et al., 2014; Mademont-Soler I. et al., 2017], а также *postmortem* при внезапной сердечной смерти [Sanchez O. et al., 2016]. Однако сочетание двух мутаций - p.Arg1420Gln+p.Glu1205Lys в гене *MYH7* у одного индивида в литературе не описано.

Согласно результатам проведенного нами нанопорового секвенирования, варианты, выявленные у данного пробанда в гене *MYH7*, находятся в цис-положении, т.е. на одной хромосоме (Рисунок 21). Этот результат очень важен для молекулярно-генетической диагностики и прогноза течения заболевания, а также для планирования беременности и проведения пренатальной диагностики,

так как говорит о том, что пациентка имеет один «здоровый» аллель – то есть она не является компаунд-гетерозиготой.

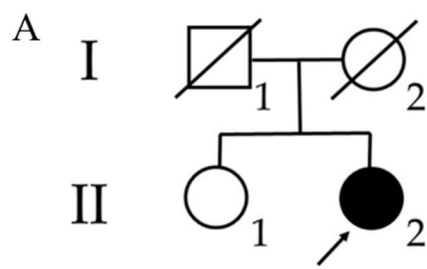
3.5 Анализ связи генотипа в генах саркомерных белков с изменчивостью клинических проявлений и эхокардиографических параметров у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией

3.5.1 Описание отдельных случаев семей с редкими патогенными вариантами в генах *MYBPC3* и *MYH7*

В обследованной выборке пациентов с ГКМП нонсенс-вариант p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3* был выявлен у четырех индивидов в гетерозиготном состоянии. Однонуклеотидный вариант 3697C>T в 33 экзоне гена *MYBPC3* приводит к образованию стоп-кодона в 1233 положении (p.Gln1233Ter, или Q1233*, rs397516037) в шестом иммуноглобулин-подобном домене C2-типа [<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q14896/>].

Первый пациент Т., женского пола, в возрасте 29 лет обратился за медицинской помощью в связи с одышкой при подъеме на 2-й этаж или при ходьбе через 100 м, колющими болями в области сердца, учащенным сердцебиением. Из анамнеза известно, что ее отец умер в 52 года от инфаркта миокарда, а мать – в 47 лет вследствие острого нарушения мозгового кровообращения (Рисунок 22А).

В результате эхокардиографического обследования пациента (Рисунок 22Б) обнаружено значительное утолщение МЖП (43 мм), обструкция ВТЛЖ (градиент до 122 мм рт. ст.), в связи с чем была проведена расширенная септальная миоэктомия. Спустя 3 года после хирургического вмешательства толщина МЖП составляла 19 мм, обструкции ВТЛЖ не наблюдалось. Мутация p.Gln1233Ter в гетерозиготном состоянии была выявлена с помощью массового параллельного и мономолекулярного секвенирования (Рисунок 22В), подтверждена с использованием секвенирования по Сэнгеру (Рисунок 22Г).



I.1 Смерть: ИМ, 52 г.
 I.2 Смерть: ОНМК, 47 л.
 II.2 Диагноз: ГКМП, 29 л.

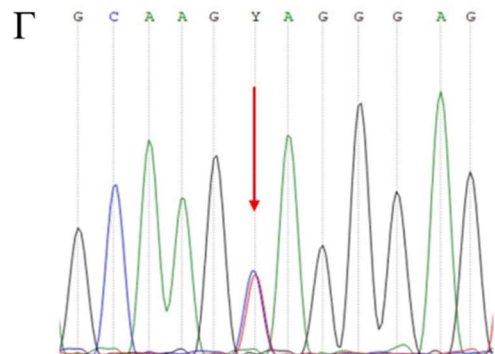
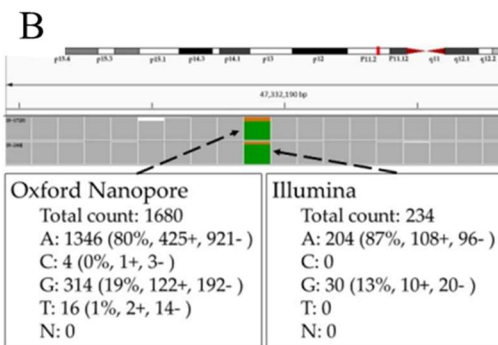
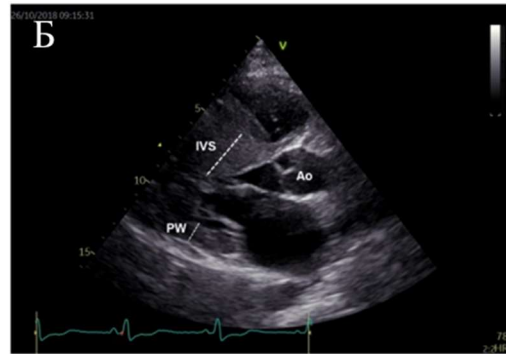


Рисунок 22. Молекулярно-генетическая диагностика с.С3697Т (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* у пациента с ГКМП: А – родословная семьи; Б – эхокардиограмма сердца; В – результат молекулярно-генетического тестирования с помощью технологий Oxford Nanopore Technologies и Illumina; Г – подтверждение варианта с помощью секвенирования по Сэнгеру. ИМ – инфаркт миокарда; ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения.

Второй пациент III., женщина, 41 год, сотягощенным семейным анамнезом – отец с диагнозом ГКМП умер в 43 года. В ходе обследования пациента выявлено утолщение миокарда с обструкцией ВТЛЖ (градиент до 70 мм рт.ст.), снижение фракции выброса ЛЖ (35%). Сопутствующая патология: хроническая сердечная недостаточность IIА ст., функциональный класс III, аритмия. Пациенту проведена спиртовая септальная абляция. Мутация p.Gln1233Ter в гетерозиготном состоянии идентифицирована по данным полноэкзомного массового параллельного секвенирования.

Третья пациентка Ф., 54 года. В результате эхокардиографического обследования у нее обнаружено утолщение МЖП (24 мм) с обструкцией ВТЛЖ (градиент до 55 мм рт.ст.). Мутация p.Gln1233Ter в гетерозиготном состоянии

выявлена с помощью мономолекулярного секвенирования и подтверждена секвенированием по Сэнгеру (Рисунок 8А).

Четвертая пациентка Л., 63 года. По данным эхокардиографического исследования у нее установлена ассиметричная гипертрофия миокарда в МЖП (21 мм) и ЗСЛЖ (18 мм) без обструкции ВТЛЖ (градиент давления 7 мм рт.ст.). Выполненное мономолекулярное секвенирование выявило нонсенс-вариант p.Gln1233Ter в гетерозиготном состоянии. Наличие данной мутации подтверждено с помощью секвенирования по Сэнгеру (Рисунок 8Б).

Следует отметить, что замена с.С3697Т (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* – один из относительно часто регистрируемых патогенных вариантов, выявляемых у пациентов с ГКМП, главным образом, в европейских популяциях.

Проведенный нами анализ публикаций, содержащих информацию о варианте p.Gln1233Ter и связанных с ним клинических проявлениях показал значительную клиническую вариабельность ГКМП (Рисунок 23).

В литературе есть сообщения о нескольких бессимптомных носителях данной мутации (Рисунок 23). Возраст начала ГКМП варьирует среди носителей p.Gln1233Ter *MYBPC3* от второго десятилетия жизни до возраста более 60 лет (Рисунок 23). Отмечается тенденция к более раннему началу заболевания у мужчин. Единственным опубликованным случаем некомпактного миокарда левого желудочка в раннем детстве является индивид с генотипом p.Gln1233Ter и другим патогенным вариантом *MYBPC3*, приводящим к замене p.Glu258Lys [Sdvigova N.A. et al., 2018].

Ранее нами было обнаружено «накопление» редких вариантов в генах, связанных с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка у пациентов с ГКМП [Salakhov R.R. et al., 2021]. Следует отметить, что несколько пациентов с симптоматической и тяжелой ГКМП, являющихся носителями мутации p.Gln1233Ter *MYBPC3*, также имеют аритмии (Рисунок 23).

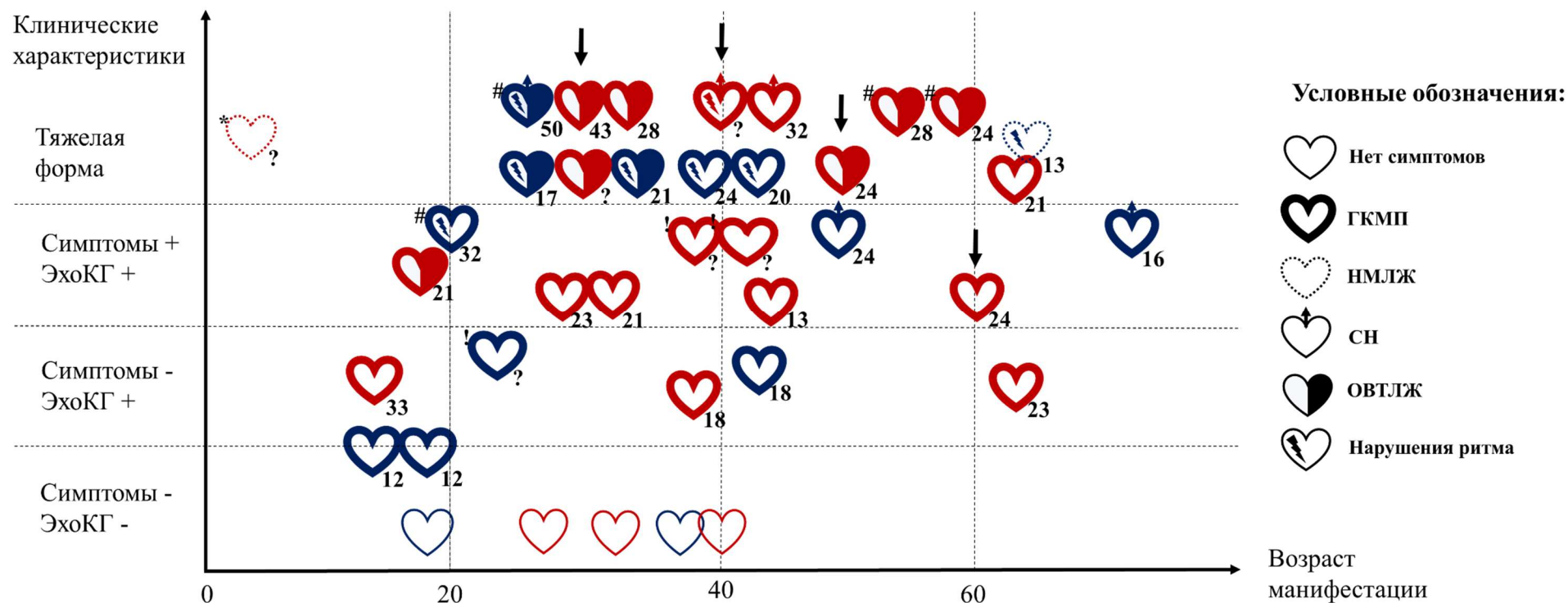


Рисунок 23. Клиническая вариабельность ГКМП у носителей p.Gln1233Ter в гене *MYBPC3*. ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, СН – сердечная недостаточность, ОВТЛЖ – обструкция выносящего тракта левого желудочка, (*) – сочетание p.Gln1233Ter и p.Glu258Lys в *MYBPC3*, (#) – сочетание p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln в *MYBPC3* (!) – сочетание p.Gln1233Ter в *MYBPC3* и p.Arg230His в *VCL*. Женщины указаны красным цветом, мужчины – синим, число снизу справа обозначает максимальную толщину левого желудочка (мм). Составлено по собственным данным (пациенты отмечены черной стрелкой), а также литературным источникам [Tóth T и др., 2011; Sdvigova N.A. и др., 2018; Erdmann J. и др., 2001; Dementyeva E.V. и др., 2020; Roncarati R. и др., 2011; O'Hare B.J. и др., 2020; Ehlermann P. и др., 2008; Fokstuen S. и др., 2008; Дземешкевич С.Л. и др., 2019; Blagova O. и др., 2022; Maron B.J. и др., 2012; Ingles J. и др., 2005; Filatova E.V., и др., 2021].

Сочетание мутации в гене *MYBPC3* и в других генах саркомерных белков у индивидов из семей с ГКМП являются причиной более тяжелого клинического фенотипа из-за эффекта «двойной дозы» [Ingles J. et al., 2019; Fourey D. et al., 2017; Zhou N. et al., 2018]. Тяжелая степень ГКМП с обструкцией ВТЛЖ была также обнаружена у пациентов с p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln в компаунд-гетерозиготном состоянии в гене *MYBPC3* у наших пациентов и в других случаях [Ingles J. et al., 2019; Chakova N.N. et al., 2018; Roncarati R. и др., 2011; Maron B.J. et al., 2012; Dementyeva E. V. et al. 2019].

Данные варианты расположены на расстоянии 14131 п.о. друг от друга и, предполагается, что они находятся цис-положении [Chakova N.N. et al., 2018]. К сожалению, нам не удалось фазировать p.Gln1233Ter и p.Arg326Gln с помощью нанопорового секвенирования из-за невозможности амплификации 6–12 экзонов.

Еще одним «частым» патогенным вариантом в нашей выборке пациентов с ГКМП является миссенс замена c.G2609A (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7*. Данный вариант выявлен у двух пациентов с ГКМП.

Клинический диагноз первого индивида Р. (женщина, 53 года) был обструктивная ГКМП (Рисунок 24) [Салахов Р.Р. и др., 2021]. Семейный анамнез по данной патологии не отягощен (Рисунок 24А).

По данным эхокардиографического обследования пациента обнаружена выраженная асимметричная гипертрофия миокарда в МЖП (20 мм), в ЗСЛЖ (9 мм) и отношением толщины МЖП к ЗСЛЖ – 2,22. Пиковый градиент обструкции в ВТЛЖ достигал 105 мм рт.ст. Фракция выброса ЛЖ составляла 63%. В результате мономолекулярного секвенирования у пациента обнаружен миссенс-вариант p.Arg870His в гетерозиготном состоянии (Рисунок 24Б). Его наличие подтверждено секвенированием по Сэнгеру (Рисунок 24В).

После клинико-генеалогического обследования и проведения каскадного генетического скрининга среди ближайших родственников установлено носительство варианта p.Arg870His у младшей дочери пробанда в гетерозиготном состоянии (Рисунок 24В). При этом жалоб и клинической картины заболевания у

дочери на момент молекулярно-генетического обследования (33 года) не наблюдается. У матери пробанда данный вариант отсутствовал. Отца пробанда на момент проведения молекулярно-генетического обследования уже не было в живых. В результате нам не удалось установить, унаследован ли данный вариант пробандом, либо возник *de novo*.

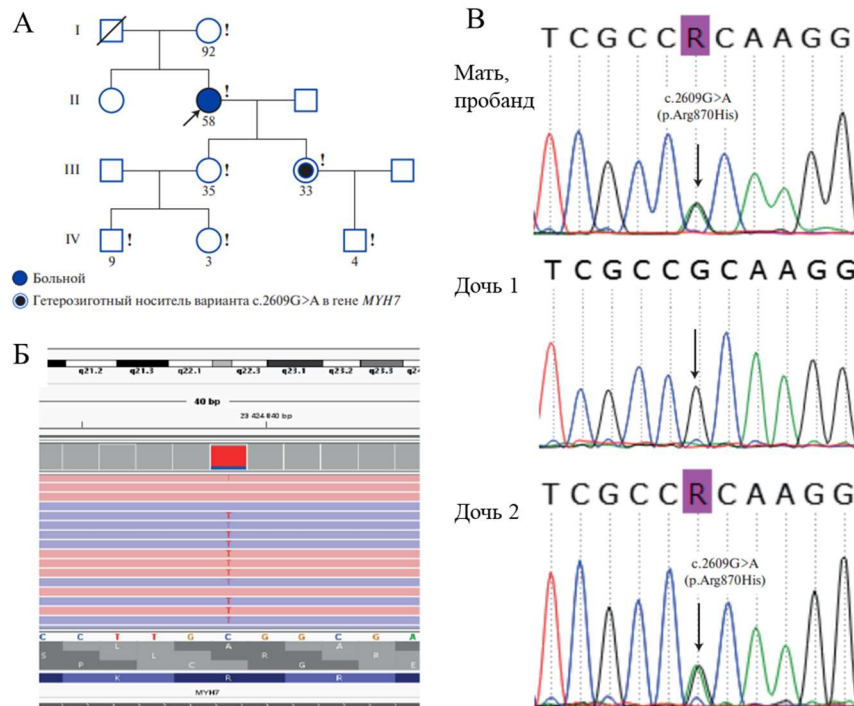


Рисунок 24. Молекулярно-генетическая диагностика варианта с.G2609A (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7* у пациента с ГКМП: А – родословная семьи (восклицательным знаком обозначены члены семьи, у которых проведено молекулярно-генетическое обследование, цифрами обозначен их возраст); Б – результат молекулярно-генетического тестирования с помощью мономолекулярного секвенирования (Oxford Nanopore Technologies); В – подтверждение варианта с помощью секвенирования по Сэнгеру у матери (пробанд) и ее одной из дочерей (2).

Вторая пациентка М., 36 лет. По данным эхокардиографического обследования обнаружена гипертрофия миокарда в МЖП (15 мм) и ЗСЛЖ (15 мм). Градиент давления в ВТЛЖ в покое не превышал допустимых значений (39 мм рт.ст.), однако во время пробы Вальсальвы он составил 70 мм рт.ст. Мутация p.Arg870His в гетерозиготном состоянии была обнаружена с помощью

мономолекулярного секвенирования и подтверждена секвенированием по Сэнгеру (Рисунок 9Б).

Замена p.Arg870His крайне редко регистрируется в популяциях (с частотой, соответствующей мутационным событиям — $4 \cdot 10^{-6}$ — $1,6 \cdot 10^{-5}$ [<https://gnomad.broadinstitute.org>], но относительно часто выявляется у пациентов с ГКМП различных национальностей (как при спорадических, так и при семейных случаях) [Nishi H. et al., 1995; Anan R. et al., 2000; Woo A. et al., 2003; Laredo R. et al., 2006; Tanjore R.R. et al., 2006; Bashyam M.D. et al., 2007; Kaski J.P. et al., 2009; Capek P. et al., 2011; Otsuka H. et al., 2012; Santos S. et al., 2012].

Несмотря на то, что данный патогенный вариант большинством исследователей рассматривается как относительно благоприятный, у носителей p.Arg870His регистрируется широкий спектр фенотипических проявлений (Рисунок 25): от бессимптомного носительства [Nishi H. et al., 1995; Tanjore R.R. et al., 2006] до тяжелой клинической картины ГКМП [Capek P. et al., 2011] и случаев внезапной сердечной смерти [Laredo R. et al., 2006; HersHKovitz T. et al., 2019]. Описано два случая гомозиготности по этой мутации у потомков близкородственных браков: у одного из носителей гомозиготного генотипа по p.Arg870His зарегистрирована внезапная смерть в 36 лет, которая наступила через несколько месяцев после имплантации кардиостимулятора, у другого — уже в 19 лет был поставлен диагноз необструктивной ГКМП.

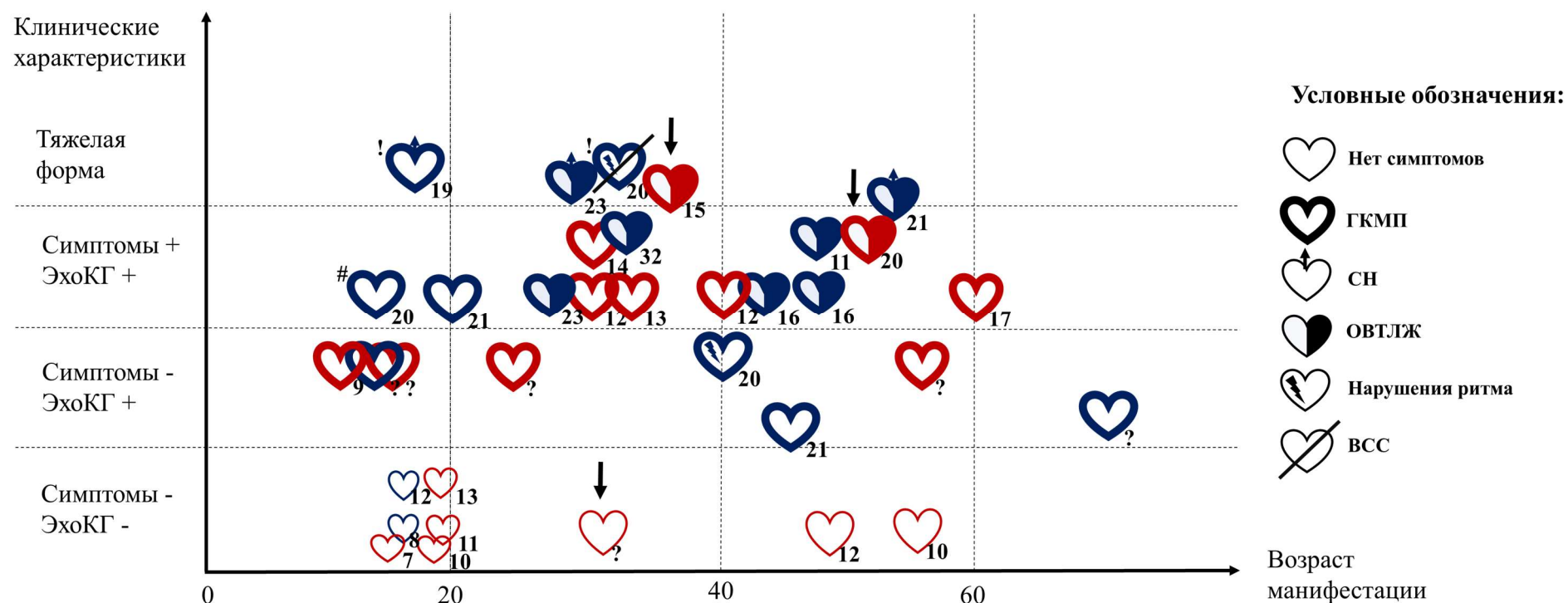


Рисунок 25. Клиническая вариабельность ГКМП у носителей p.Arg870His в гене *MYH7*. ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия, НМЛЖ – некомпактный миокард левого желудочка, СН – сердечная недостаточность, ОВТЛЖ – обструкция выносящего тракта левого желудочка, ВСС – внезапная сердечная смерть, (*) – сочетание p.Arg870His и p.Glu258Lys в *MYH7*, (#) – сочетание p.Arg870His и p.Arg54Ter в *MYH7*, (!) – гомозиготное носительство p.Arg870His в *MYH7*. Женщины указаны красным цветом, мужчины – синим; число снизу справа обозначает максимальную толщину левого желудочка (мм). Составлено по собственным данным (пациенты отмечены черной стрелкой), а также литературным источникам [Tanjore R.R. et al., 2006; Nishi H. et al., 1995; Laredo R. et al., 2006; Capek P. et al., 2011; Ferradini V. et al., 2021].

Клинические симптомы у носителей данного варианта в гетерозиготном состоянии варьируют как между членами одной семьи, так и между представителями разных семей. Обширная информация получена, в частности, при изучении большой индийской семьи, отягощенной ГКМП, причиной которой является замена p.Arg870His [Bashyam M.D. et al., 2007; Tanjore R.R. et al., 2006]. Авторами установлена высокая клиническая гетерогенность ГКМП у носителей данного патогенного варианта (от бессимптомного носительства, как правило у лиц более молодого возраста, – до ранней смерти). Среди членов родословной, отягощенной ГКМП, из Индии 75% мужчин и 44% женщин с вариантом p.Arg870His имели клинические симптомы ГКМП, а пенетрантность варианта в среднем составила 59% [Tanjore R.R. et al., 2006].

Широко варьирует и возрастной диапазон манифестации болезни – от второго десятилетия жизни до 70 лет (Рисунок 25), но, как отмечают авторы некоторых исследований (см., например, [Tanjore R.R. et al., 2006]), этот показатель точен только для пробандов, так как состояние здоровья других носителей данного патогенного варианта оценивается только при скрининге (т. е. возраст начала болезни должен быть более ранним). В целом бессимптомное носительство данного варианта характерно для молодых индивидов, а у пожилых, если и не выявлялись признаки ГКМП при Эхо-КГ, регистрировались клинические симптомы данной патологии.

Один из первых опубликованных случаев сочетания двух мутаций в гене *MYH7*, то есть компаунд-гетерозиготный генотип, также был связан с мутацией p.Arg870His: кроме этого варианта, пациент имел нонсенс-мутацию в 3 экзоне, которая приводила к формированию стоп-кодона в 54 кодоне – p.Arg54Ter (Рисунок 25). Такое сочетание вариантов обусловило раннее развитие ГКМП (в 16 лет) и быстрое прогрессирование заболевания (ухудшение по ЭКГ параметрам и Эхо-КГ) [Nishi H. et al., 1995]. Патогенный вариант p.Arg870His был унаследован от отца (болезнь у которого развилась в 40 лет), а второй, p.Arg54Ter – от

бабушки по материнской линии (и бабушка, и мать были здоровы). Таким образом, сочетание двух мутаций, унаследованных от родителей, привело к развитию ГКМП в раннем возрасте и более тяжелому ее течению. Кроме того, авторы заметили, что, по-видимому, нонсенс-мутации в гене *MYH7* в гетерозиготном состоянии фенотипически не проявляются. Вариант p.Arg870His был выявлен в этом исследовании в трех родословных, и 9 из 10 носителей этого варианта имели гипертрофию миокарда на момент обследования [Nishi H. et al., 1995].

Интересно, что в недавнем исследовании [Ferradini V. et al., 2021] патогенный вариант p.Arg870His гена *MYH7* рассматривается как причина аритмогенной кардиомиопатии (Рисунок 25): у мужчины в 43 года был синкопальный эпизод с широким QRS и сложной тахикардией на ЭКГ при лечении амиодароном, через два года ему был имплантирован кардиовертер-дефибриллятор по причине мономорфной желудочковой тахикардии после обморока (задокументирована при ЭКГ). Патогенный вариант p.Arg870His гена *MYH7* у данного мужчины возник *de novo*, и был унаследован одной из его дочерей, у которой в возрасте 18 лет не было выявлено никаких отклонений при мониторинговании ЭКГ по Холтеру, а также при проведении Эхо-КГ и компьютерной томографии сердца, но регистрировались одышка, сердцебиение, а также эпизоды синусовой тахикардии при сердцебиении и обмороках [Ferradini V. et al., 2021].

Проведенный нами анализ доступных данных о фенотипическом проявлении патогенного варианта c.2609G>A (p.Arg870His) в гене *MYH7* позволяет сделать вывод о том, что этот вариант в большинстве случаев характеризуется умеренной степенью тяжести течения заболевания и невысоким риском внезапной смерти, что согласуется с клиническими особенностями заболевания в представленных нами двух случаях. Неполная пенетрантность, редкость случаев внезапной смерти и возможность выживания гомозигот до

взрослого возраста указывают на преимущественно “незлокачественное” течение заболевания у носителей этой мутации.

3.5.2 Ассоциации полиморфизма генов саркомерных белков с выраженностью гипертрофии миокарда

Для анализа ассоциаций выявленного полиморфизма пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) с эхокардиографическими признаками гипертрофии миокарда были выбраны распространенные SNP с возможной функциональной значимостью по результатам анализа с помощью CADD (см. раздел 3.2), популяционная частота которых была не менее 15%, а также некоторые варианты, для которых ранее были выявлены ассоциации с фенотипами, имеющими отношение к клинической картине гипертрофии миокарда. Список 17 кандидатных SNP представлен в таблице 11.

Анализ проводили только для группы пациентов с ГКМП, в связи с малой численностью выборки пациентов с сочетанием ГЛЖ при АГ. Фактические численности выборок для отдельных признаков могут отличаться в связи с тем, что не для всех пациентов были известны все показатели. Данные об изменчивости анализируемых признаков представлены в таблице 12.

Подгруппы пациентов с ГКМП, обследованных в г. Томске и в г. Новосибирске, не различались между собой по возрасту и по большинству анализируемых количественных признаков, за исключением толщины межжелудочковой перегородки и толщины задней стенки левого желудочка, для которых медианные значения в подгруппе новосибирских пациентов были выше, чем в подгруппе томских пациентов. В дальнейшем анализе пациенты с ГКМП объединены в одну группу.

Таблица 11. Однонуклеотидные варианты-кандидаты для анализа ассоциаций у пациентов с ГКМП

№	Локализация в геноме (GRCh38)	Референсный/ альтернативный аллель (Ref/Alt)	rsID	Численность генотипов		
				Ref/ Ref	Ref/ Alt	Alt/ Alt
Ген <i>TNNT2</i>						
1	1:201365254	G/A	rs3729547	10	33	33
2	1:201369768	T/C	rs10920184	10	36	18
3	1:201372048	AGAAG/-	rs45533739	7	24	21
4	1:201362426	T/G	rs1104859	6	11	20
Ген <i>TPM1/TPM1-AS</i>						
5	15:63071455	A/G	rs8519	18	2	16
6	15:63059641	C/A	rs1071646	15	19	42
7	15:63048217	A/G	rs73431508	29	14	3
8	15:63048408	T/C	rs4075047	33	20	5
9	15:63048506	C/T	rs111470259	41	18	5
10	15:63049039	G/C	rs66793829	41	16	1
11	15:63051119	T/C	rs3803499	31	14	3
Ген <i>TNNI3</i>						
12	19:55157437	T/C	rs11671293	29	15	8
Ген <i>MYBPC3</i>						
13	11:47333236	C/T	rs1052373	26	33	17
14	11:47338861	T/C	rs2269434	23	15	23
Ген <i>MYH7</i>						
15	14:23431585	G/A	rs2069542	55	18	1
16	14:23418436	T/C	rs7159367	28	19	5
17	14:23423679	A/G	rs7157716	35	28	12

В общей группе пациентов различие между полами было выявлено только по возрасту обследования/диагноза (для мужчин медианное значение возраста составило 47,5 лет, а для женщин 55,9 лет, $p=0,0048$). Корреляционный анализ (непараметрический коэффициент корреляции Спирмена) не выявил значимой связи анализируемых признаков с возрастом. Отсутствие статистически значимых различий между мужчинами и женщинами в изменчивости эхокардиографических признаков позволило анализировать их в одной группе без поправок на пол.

Таблица 12. Анализируемые количественные признаки у пациентов с ГКМП

Признак	N	Среднее значение	95% ДИ	Стандартное отклонение	Медиана	Нижний квартиль	Верхний квартиль
Возраст	73	50,49	46,89 – 54,10	15,44	54,00	39,00	64,00
МЖП, мм	66	21,93	20,08 – 23,78	7,52	19,65	17,00	25,00
ЗСЛЖ	56	13,89	12,99 – 14,78	3,35	13,75	12,00	16,00
МЖП/ЗСЛЖ	55	1,578	1,36 – 1,80	0,80	1,38	1,20	1,77
ФВ, %	40	71,95	68,33 – 75,57	11,32	72,00	63,50	80,50
Градиент давления ВТЛЖ	52	55,92	46,18 – 65,67	35,01	49,54	30,47	73,70
Градиент давления ВТЛЖ, проба Вальсальвы	32	76,88	63,54 – 90,22	37,00	82,23	54,39	96,88
ММЛЖ	53	341,75	310,06 – 373,43	114,94	329,00	257,86	397,61
ИММЛЖ	49	183,48	165,17 – 201,79	63,76	179,92	134,00	209,613

Ввиду небольшой численности отдельных подгрупп пациентов с определенными генотипами, а также в связи с отклонением распределения значений признаков от нормального распределения в некоторых случаях, основным методом сравнения групп был критерий Манна-Уитни, который относится к непараметрическим критериям и предназначен для парных сравнений. Таким образом, с помощью этого критерия проводили парные сравнения групп с различными генотипами по отдельным SNP или по гаплотипам. Кроме сравнения отдельных генотипов, в некоторых случаях объединяли гетерозигот с гомозиготами по редкому аллелю («доминантная модель»). Кроме общей группы пациентов, рассматривали также подгруппы

пациентов, у которых были выявлены (или не было выявлено) варианты III–V классов патогенности, а также подгруппу пациентов с началом заболевания во взрослом возрасте (старше 30 лет однонуклеотидный вариант).

3.5.2.1 Анализ ассоциаций с генотипами по отдельным однонуклеотидным вариантам

Сравнение значений признаков между подгруппами пациентов с разными генотипами (по отдельным SNP) выявило небольшое количество статистически значимых различий (Приложение Д).

Для гена **тропонина I** анализ ассоциаций был проведен для частого полиморфизма 19:55157437-T-C (rs11671293). Сравнение гомозигот по референсному аллелю (ТТ) с объединенными гомо- и гетерозиготами по альтернативному варианту (ТС+СС) выявило различия в возрасте начала заболевания, который был ниже у носителей аллеля «С» в группе пациентов старше 30 лет (Рисунок 26А). Кроме того, при сравнении этих генотипов у пациентов с выявленными мутациями (варианты III–V классов патогенности) возраст начала заболевания также был ниже у носителей аллеля «С», с медианным значением 38 лет, по сравнению с 62,5 годами у гомозигот ТТ (Рисунок 26В).

С другой стороны, при сравнении генотипов в подгруппе пациентов, у которых не были выявлены варианты III–V классов патогенности, обнаружена ассоциация аллеля «С» с величиной фракции выброса левого желудочка, при этом носители аллеля «С» имели нормальные значения этого показателя (медиана 62,5%), а гомозиготы по референсному аллелю – повышенные (медиана 80%) (Рисунок 26Б). Увеличение фракции выброса левого желудочка свидетельствует о повышении силы сокращения сердца и может говорить о механизме компенсации дисфункции миокарда, который не выражен у носителей аллеля «С» rs11671293.

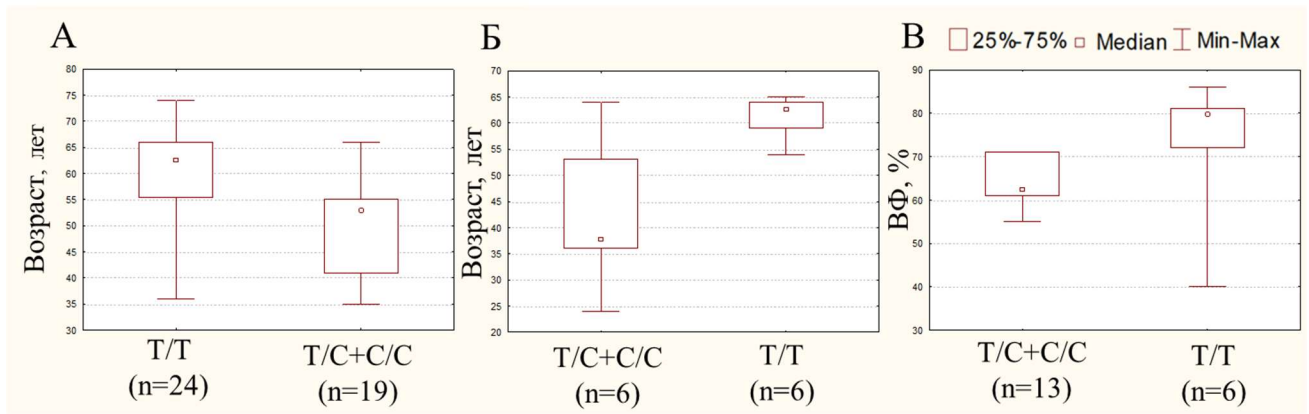


Рисунок 26. Анализ ассоциаций полиморфизма 19:55157437-T-C (rs11671293) гена *TNN13*. А – с возрастом начала заболевания в группе пациентов старше 30 лет; Б - с возрастом начала заболевания в группе пациентов с выявленными вариантами III-V классов патогенности; В - с фракцией выброса в группе пациентов без выявленных вариантов III-V классов патогенности.

Интересно, что rs11671293 в нашей выборке является полностью сцепленным с инсерцией четырех нуклеотидов в первом интроне гена, rs377373012 (19:55157354;-/CTGT), расположенной в 45 нуклеотидах перед началом второго экзона, который начинается в позиции 19:55157309 (ген расположен на комплементарной цепи по отношению к референсной последовательности генома).

Полученные результаты позволяют предполагать, что rs11671293 (возможно, в сочетании с rs377373012) может иметь в целом неблагоприятный эффект, модифицирующий фенотипическое проявление кардиомиопатии: более редкий аллель С ассоциирован с меньшими значениями фракции выброса (в пределах нормы) и более ранним началом заболевания.

Этот эффект может быть связан с изменением экспрессии гена, на что указывает его роль в качестве eQTL [<https://gtexportal.org/>]; кроме того, согласно инструменту ADASTARA есть вероятность аллель-специфичного связывания транскрипционного фактора SPI1 [<https://adastra.autosome.org/>], для которого, в свою очередь, показана роль в развитии поражения миокарда при инфаркте [Liu Z., Huang S., 2022].

В гене *MYH7* анализ был проведен для трех SNP. Вариант rs2069542 ассоциирован с градиентом давления в выводном тракте левого желудочка в подгруппе пациентов без патогенных вариантов в исследованных генах: гетерозиготы имели более высокие значения этого показателя (медиана 54,2 мм рт. ст.), по сравнению с гомозиготами по референсному аллелю (38,2 мм рт. ст.) (Рисунок 27А).

Высокие значения градиента давления свидетельствуют о субаортальной обструкции, связанной с гипертрофией межжелудочковой перегородки. Данный полиморфизм является синонимичным и представляет собой замену в последнем нуклеотиде экзона 8, в третьей позиции кодона 244, кодирующего фенилаланин. В настоящее время нет доказательств функциональной значимости этого варианта. В частности, неизвестно, может ли он оказывать какой-либо эффект на процесс сплайсинга или на экспрессию гена (гуанин, являющийся референсным вариантом, входит в состав CpG-сайта). Таким образом, выявленная ассоциация требует дальнейшего подтверждения и исследования механизма эффекта данного варианта.

Для rs7157716 выявлена ассоциация с отношением толщины межжелудочковой перегородки к толщине задней стенки левого желудочка, т.е. с показателем, характеризующим степень асимметрии гипертрофии миокарда (Рисунок 27Б). Гетерозиготы имели более высокие значения этого отношения (медиана 1,6) по сравнению с гомозиготами по референсному (частому) аллелю (медиана 1,2). Эта ассоциация была выявлена в подгруппе пациентов старше 30 лет, т.е. с поздним началом заболевания.

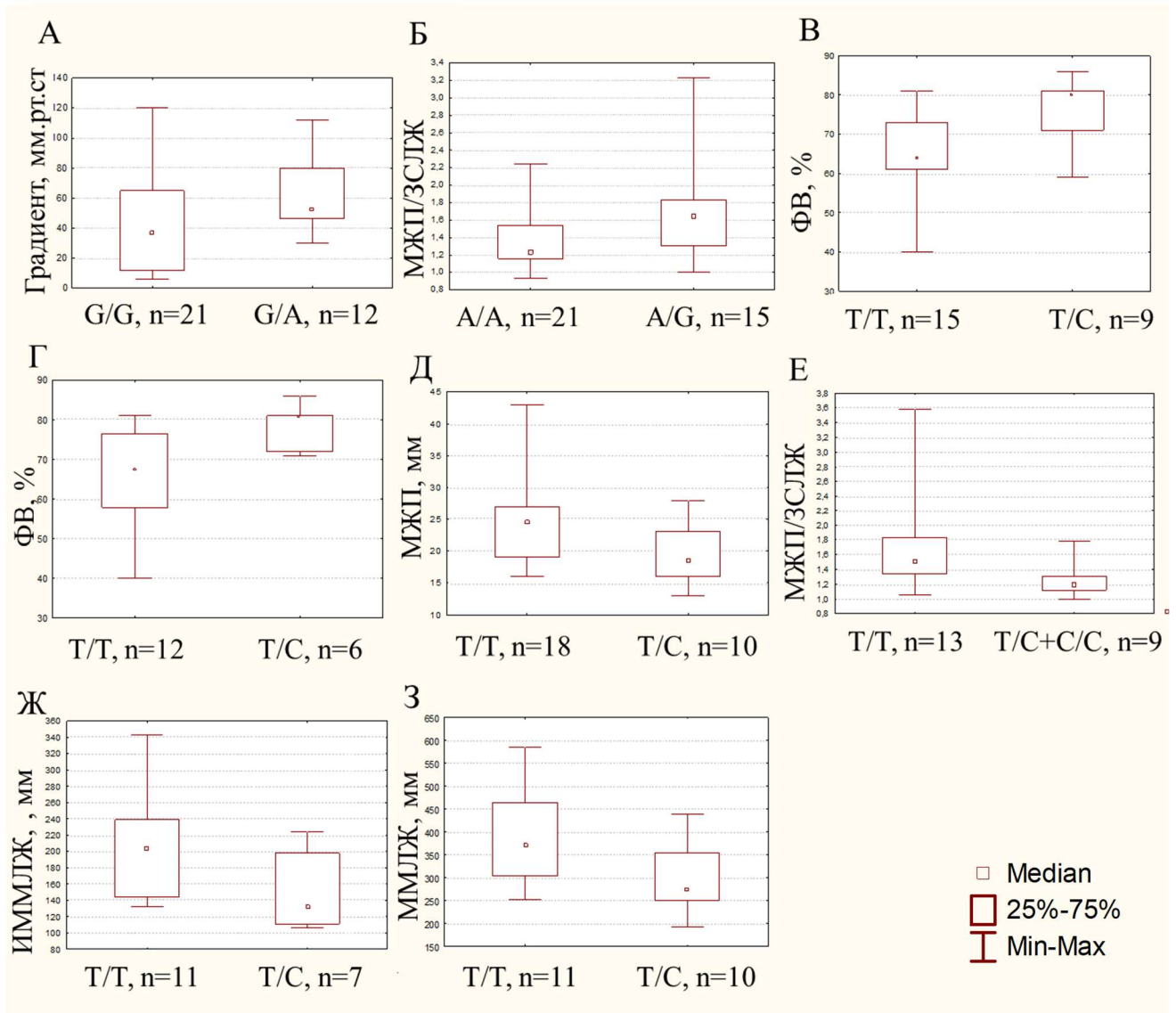


Рисунок 27. Анализ ассоциаций полиморфизма гена *MYH7*. А - rs2069542 с градиентом давления в выводном тракте левого желудочка в подгруппе пациентов без выявленных вариантов III-V классов патогенности; Б – rs7157716 с отношением толщины межжелудочковой перегородки к толщине задней стенки левого желудочка (МЖП/ЗСЛЖ) в подгруппе пациентов старше 30 лет; В – rs7159367 с фракцией выброса левого желудочка; Г - rs7159367 с фракцией выброса левого желудочка у пациентов без выявленных вариантов III-V классов патогенности; Д – rs7159367 с толщиной межжелудочковой перегородки у пациентов без выявленных вариантов III-V классов патогенности; Е - rs7159367 с отношением толщины межжелудочковой перегородки к толщине задней стенки левого желудочка (МЖП/ЗСЛЖ) у пациентов без выявленных вариантов III-V классов патогенности; Ж – rs7159367 с индексом массы миокарда левого желудочка (ИМЛЖ); З – rs7159367 с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ).

Вариант расположен в 24 экзоне гена и является синонимичным (третья позиция кодона 989, кодирующего изолейцин). Интересно, что ранее для этого полиморфизма была выявлена ассоциация с индексом массы миокарда у пациентов с ГКМП, а также с индексом массы миокарда и толщиной межжелудочковой перегородки у пациентов с эссенциальной гипертензией [Макеева О.А., 2004]. Как и для предыдущего варианта, неизвестно, является ли этот вариант сам по себе функционально значимым, или он сцеплен с еще невыявленным вариантом, модифицирующим развитие гипертрофии миокарда.

Полиморфизм rs7159367 ассоциирован с фракцией выброса левого желудочка в общей группе пациентов, а также с рядом эхокардиографических параметров в подгруппе пациентов, у которых не было выявлено вариантов III–V классов патогенности (Рисунок 27В-3, Приложение Д). Интересно, что фракция выброса ЛЖ выше у носителей редкого аллеля «С», но при этом у них же ниже степень выраженности гипертрофии миокарда. Таким образом, можно говорить о «благоприятном» эффекте аллеля «С» в отношении сократительной функции миокарда. Как уже упоминалось (см. раздел 3.2.2.1), этот вариант расположен в интроне 29 вблизи сайтов, связанных со сплайсингом и с микроРНК *MIR208B*.

Из двух проанализированных полиморфизмов гена *MYBPC3* только для rs2239434 выявлено статистически значимое различие анализируемого признака, а именно толщины задней стенки левого желудочка, медианное значение которого составило 16 мм у гомозигот по референсному аллелю (ТТ) и 13 мм в объединенной группе гетерозигот и гомозигот по производному аллелю (ТС+СС) (Рисунок 28).

Данный вариант расположен в 21 интроне, на расстоянии 182 нуклеотида от начала 22 экзона. Можно отметить, что эта позиция входит в потенциальный сайт связывания транскрипционного фактора ZBTB12, задействованного в клеточной дифференцировке, и замена Т на С нарушает консенсус. Однако значение показателя PHRED CADD v1.6 для этой замены составляет всего 1,23. Таким

образом, маловероятно, что данный полиморфизм сам по себе имеет функциональный эффект.

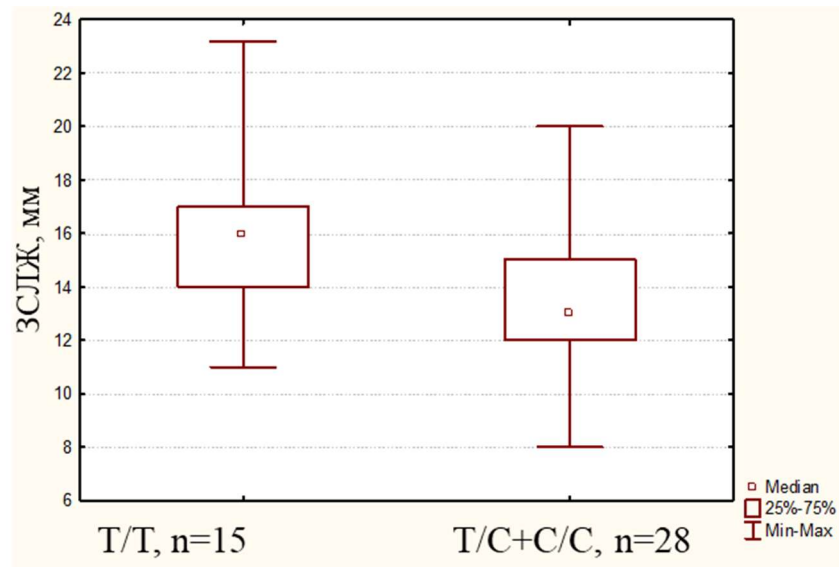


Рисунок 28. Анализ ассоциаций полиморфизма rs2239434 гена *MYBPC3* с толщиной задней стенки левого желудочка (ЗСЛЖ).

Для rs1052373 гена *MYBPC3* ассоциаций не было выявлено, хотя именно этот полиморфизм ранее был показан как ассоциированный с эхокардиографическими параметрами, как при ГКМП, так и при эссенциальной гипертензии с гипертрофией левого желудочка [Макеева О.А., 2004].

Гомозиготы по делеции пяти нуклеотидов (AGAAG) в интроне гена *TNNT2*, rs45533739 имели более высокие значения массы миокарда левого желудочка и индекса массы миокарда левого желудочка, по сравнению с гетерозиготами, при условии исключения из анализа пациентов с крайней степенью гипертрофии миокарда (ИММЛЖ>300; Рисунок 29). При объединении гомозигот без делеции и гетерозигот ассоциация сохранялась. Для остальных вариантов в этом гене не было показано статистически значимых различий.

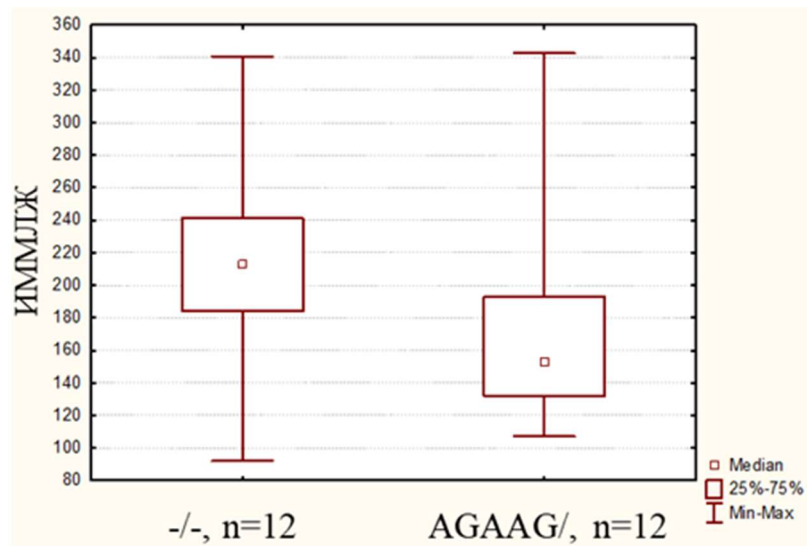


Рисунок 29. Анализ ассоциаций полиморфизма rs45533739 гена *TNNT2* с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

В гене *TPM1* анализ ассоциаций был проведен для семи SNP и четыре из них (rs8519, rs1071646, rs3803499 и rs66793829) показали статистически значимую связь с эхокардиографическими параметрами. Гомозиготы GG по полиморфизму rs8519 имели более высокие значения толщины межжелудочковой перегородки, массы миокарда и индекса массы миокарда по сравнению с гомозиготами по референсному аллелю (AA) (Рисунок 30А-В).

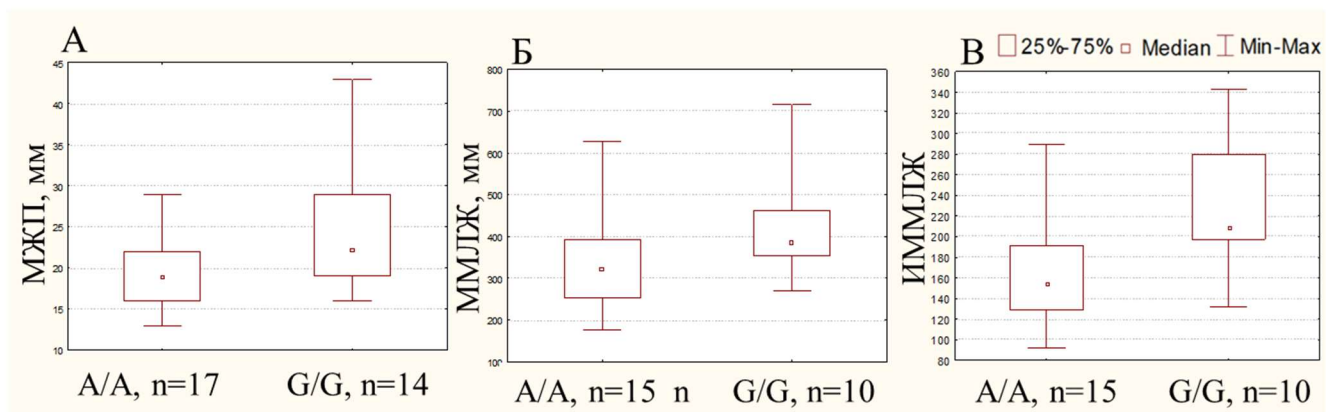


Рисунок 30. Анализ ассоциаций полиморфизма rs8519 в гене *TPM1*. А – с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП); Б – с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); В – с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

Гомозиготы AA по полиморфизму rs1071646 имели более высокие значения толщины межжелудочковой перегородки, массы миокарда и индекса массы миокарда по сравнению с гомозиготами по референсному аллелю (CC) (Рисунок 31А-В). Для индекса массы миокарда ассоциация сохранялась и при объединении гомозигот CC с гетерозиготами CA (Рисунок 31Г).

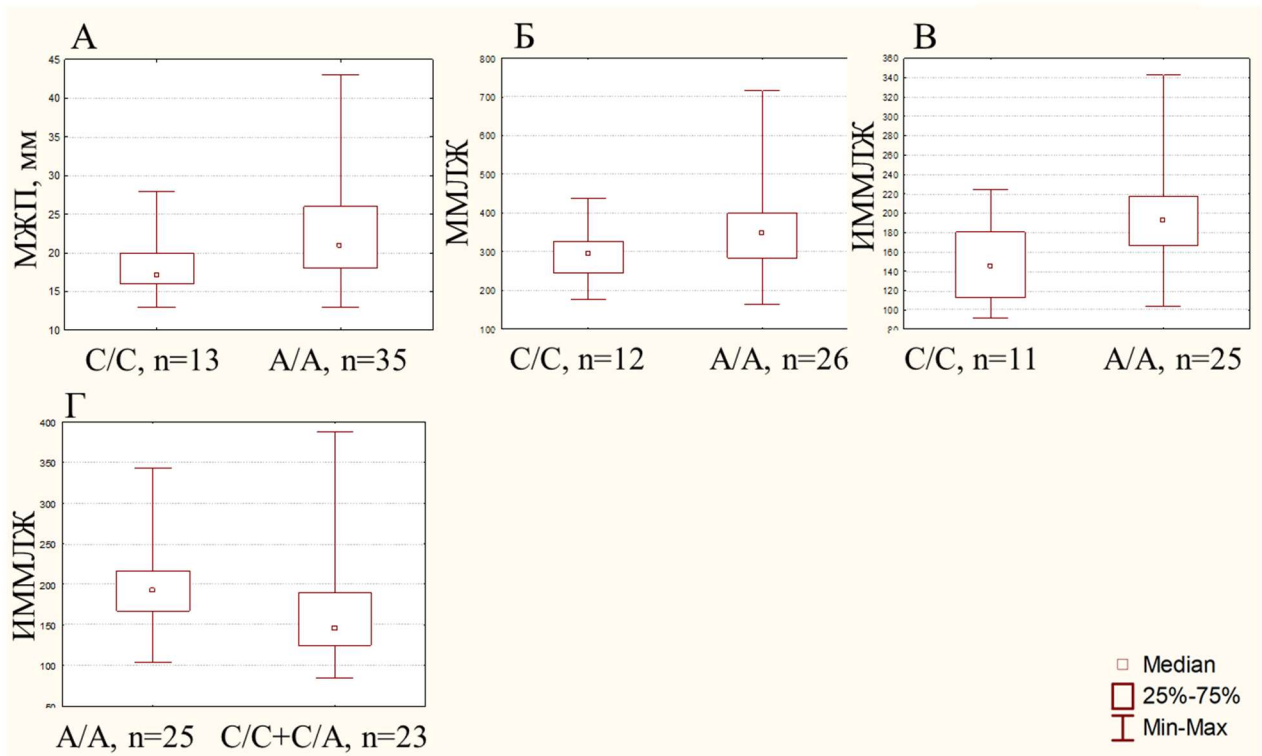


Рисунок 31. Анализ ассоциаций полиморфизма rs1071646 в гене *TPM1*. А – с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП); Б – с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); В и Г – с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

Гомозиготы по референсному аллелю (TT) полиморфизма rs3803499 имели более высокие значения фракции выброса левого желудочка, по сравнению с носителями альтернативного аллеля (TC+CC) (Рисунок 32А). Гомозиготы по референсному аллелю (GG) rs66793829 имели более высокие значения индекса массы миокарда, по сравнению с гетерозиготами (GC) (Рисунок 32Б).

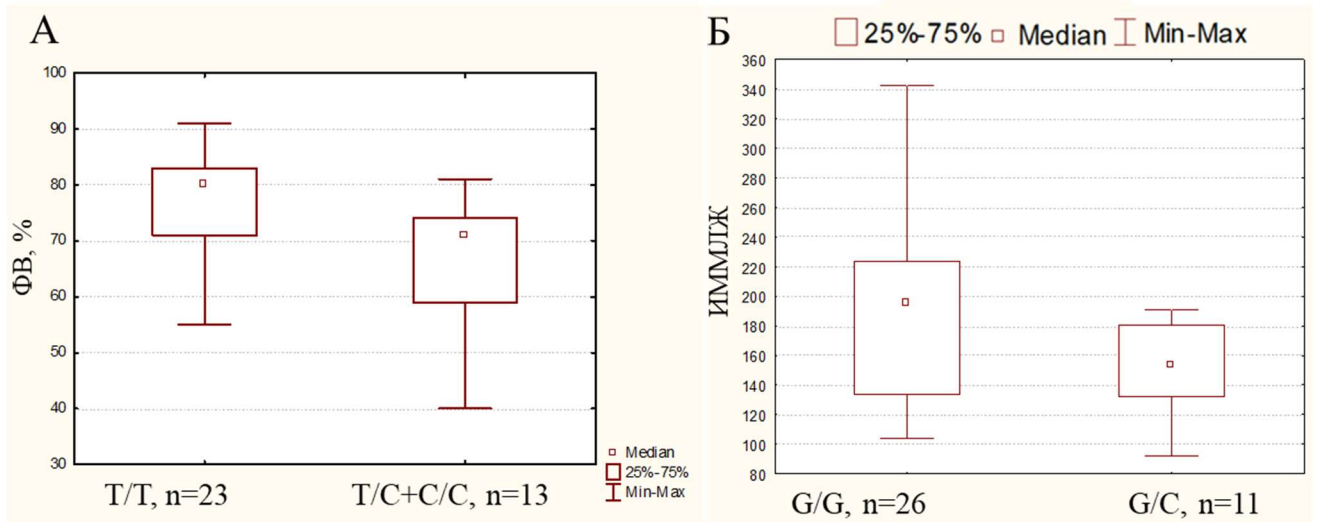


Рисунок 32. Анализ ассоциаций полиморфизма в гене *TPM1*. А - rs3803499 с фракцией выброса левого желудочка, Б - rs66793829 с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ).

Следует отметить, что два полиморфизма, rs8519 и rs1071646, находятся в сильном неравновесии по сцеплению ($D'=0,94$). С другой стороны, rs66793829 и rs3803499 также сцеплены между собой, но в меньшей степени ($D'=0,87$). Как можно судить по структуре гаплотипов, полученных с помощью нанопорового секвенирования (Приложение Г), «альтернативные» аллели этих двух пар SNP находятся на разных гаплотипах. Таким образом, схожий характер ассоциаций rs8519 и rs1071646 с показателями гипертрофии миокарда обусловлен, скорее всего, сцеплением между ними, а ассоциация rs6679829 с ИММЛЖ является независимой. В любом случае, полученные результаты указывают на модифицирующий эффект полиморфизма *TPM1* в отношении формирования гипертрофии миокарда.

3.5.2.2 Анализ ассоциаций с гаплотипами генов *TNNT2* и *TPM1*

Для выявления сочетанного эффекта вариантов в генах *TNNT2* и *TPM1* мы проанализировали гаплотипы, образованные наиболее частыми сцепленными друг с другом вариантами. Для этого объединили в группы гаплотипы,

установленные по результатам нанопорового секвенирования. Структура этих объединенных гаплотипов приведена в таблице 13.

Таблица 13. Структура гаплотипов *TNNT2* и *TPM1* для анализа ассоциаций с количественными признаками

rsID	R*/A*	Гаплотип 1/2/3
Ген <i>TNNT2</i>		
rs1104859	T/G	G/T/-
rs1892027	T/C	C/T/-
rs3729547	G/A	A/G/-
rs10920184	T/C	C/T/-
rs4915240	G/A	A/G/-
rs45533739	I (AGAAG)/D	D/I/-
rs947485	A/G	G/A/-
Номера суммированных гаплотипов из таблицы 8		1,4,12,13,14,19/ 2,10/ -
Ген <i>TPM1</i>, 3'-UTR		
rs8519	A/G	G/A/A
rs6738	C/T	T/C/C
rs707602	T/C	T/C/T
rs7178040	G/T	G/T/G
Номера суммированных гаплотипов из Приложения Г		1,2,4-8,15-17,29,30,32-36,43,45-50/ 9,10,14,20-22,25,38,41/ 3,11-13,18,19,23,24,26-28,31,37,39,40
Ген <i>TPM1</i>, <i>TPM1-AS</i> регион		
rs66793829	G/C	G/C/G
rs9803499	T/C	T/C/C
Номера суммированных гаплотипов из Приложения Г		1-3,5,9-10,12,14-15,17,19-21,24-26,29,32- 46,49-50/ 4,11,13,18, 23/ 6-8,16,27-28, 30- 31,47-48

Примечание: R* - референсный аллель, A* - альтернативный аллель.

Как уже отмечено при описании гаплотипов *TNNT2*, гаплотипы 1 и 2 являются наиболее частыми: 56% и 26% соответственно. Остальные 18% гаплотипов в выборке отличались от них по одному или двум вариантам. Анализ ассоциаций был проведен для сочетаний гаплотипов 1 и 2, а также для гетерозигот и гомозигот по гаплотипу 1 (Рисунок 33).

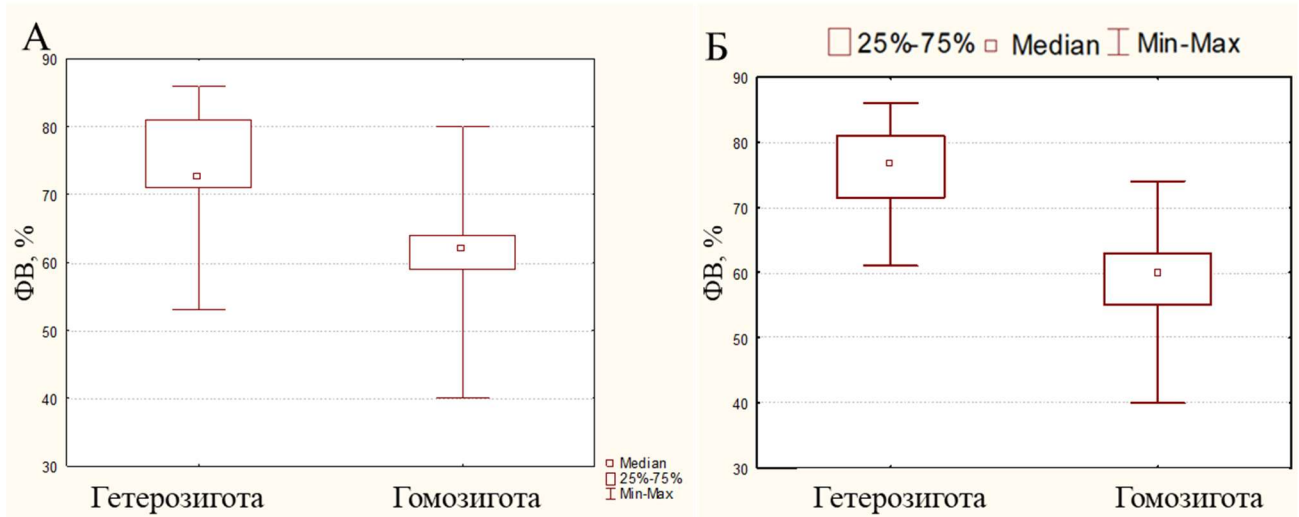


Рисунок 33. Анализ ассоциаций гаплотипа 1 в гене *TNNT2*. А – с фракцией выброса у гомозигот и гетерозигот; Б – с фракцией выброса у гомозигот и гетерозигот у пациентов с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) менее 300.

Сравнение изменчивости исследуемых фенотипических признаков в группах пациентов, являющихся гетеро- либо гомозиготами по гаплотипу 1, выявило более низкие значения фракции выброса у гомозигот, по сравнению с гетерозиготами (второй аллель относился либо к гаплотипу 2, либо к другим вариантам; Рисунок 33А). Медианное значение этого показателя составило для гомозигот 62% (квартили 59% и 64%), а для гетерозигот 72,5% (квартили 71% и 81%). Уровень значимости для критерия Манна-Уитни составил 0,023. При исключении из анализа пациентов с высокими значениями ИММЛЖ (более 300) ассоциация сохранялась: уровень значимости 0,0047; медиана и quartили 60% (55%; 63%) для гомозигот по гаплотипу 1 и 76,5% (71%; 81%) для гетерозигот (Рисунок 33Б).

Гаплотип 1 характеризуется делецией 5 нуклеотидов в интроне 3 (rs45533739). Как показано выше, гомозиготность по делеции ассоциирована с более выраженной гипертрофией миокарда. Однако гомозиготный гаплотип 1 ассоциирован с низкой фракцией выброса, а не с индексом массы миокарда. Следует отметить, что делеция rs45533739 встречается еще на нескольких гаплотипах. Таким образом, ассоциация с толщиной межжелудочковой

перегородки и массой миокарда может быть связана именно с эффектом делеции, тогда как ассоциация с фракцией выброса обусловлена сочетанным эффектом нескольких вариантов, образующих частый гаплотип.

В 3'-UTR гена *TPM1* было выделено три гаплотипа: первый характеризовался «альтернативными» аллелями rs8519 и rs6738, второй – «альтернативными» аллелями rs707602 и rs7178040, третий – референсными аллелями по всем четырем полиморфизмам (Таблица 13). Сравнение подгрупп пациентов, имеющих и не имеющих эти гаплотипы (отдельно для каждого гаплотипа) с помощью критерия Манна-Уитни выявило ассоциацию гаплотипа 1 с более высокими значениями МЖП, ММЛЖ, ИММЛЖ (Рисунок 34А-В), а также ассоциацию гаплотипа 3 с относительно низкими значениями МЖП, МЖП/ЗСЛЖ, ММЛЖ, ИММЛЖ (Рисунок 34Г-Ж). Для гаплотипа 2 не было показано статистически значимых ассоциаций.

В области гена антисмысловой РНК (*TPM1-AS*), расположенного во втором интроне *TPM1*, также можно выделить гаплотипы, образованные двумя полиморфизмами, один из которых ассоциирован с фракцией выброса (rs3803499), а другой – с ИММЛЖ (rs66793829). Таким образом, объединенный гаплотип 1' образован референсными аллелями для обоих SNP, гаплотип 2' – «альтернативными» аллелями для обоих SNP, гаплотип 3' – референсным аллелем rs66793829 и «альтернативным» аллелем rs3803499 (таблица 13).

Среди пациентов только два человека не имели в своём генотипе гаплотипа 1'. Таким образом, анализ был проведен для трех групп (генотипов): гомозиготы 1'/1', гетерозиготы 1'/2', гетерозиготы 1'/3'. Отдельно сравнивали присутствие в генотипе гаплотипа 2' или гаплотипа 3' против остальных генотипов.

Согласно результатам проведенного анализа, гетерозиготы 1'/2' имеют меньшие значения ММЛЖ и ИММЛЖ по сравнению с гомозиготами 1'/1' (Рисунок 35 А,Б), а также по сравнению с гетерозиготами 1'/3' (Рисунок 35 В,Г).

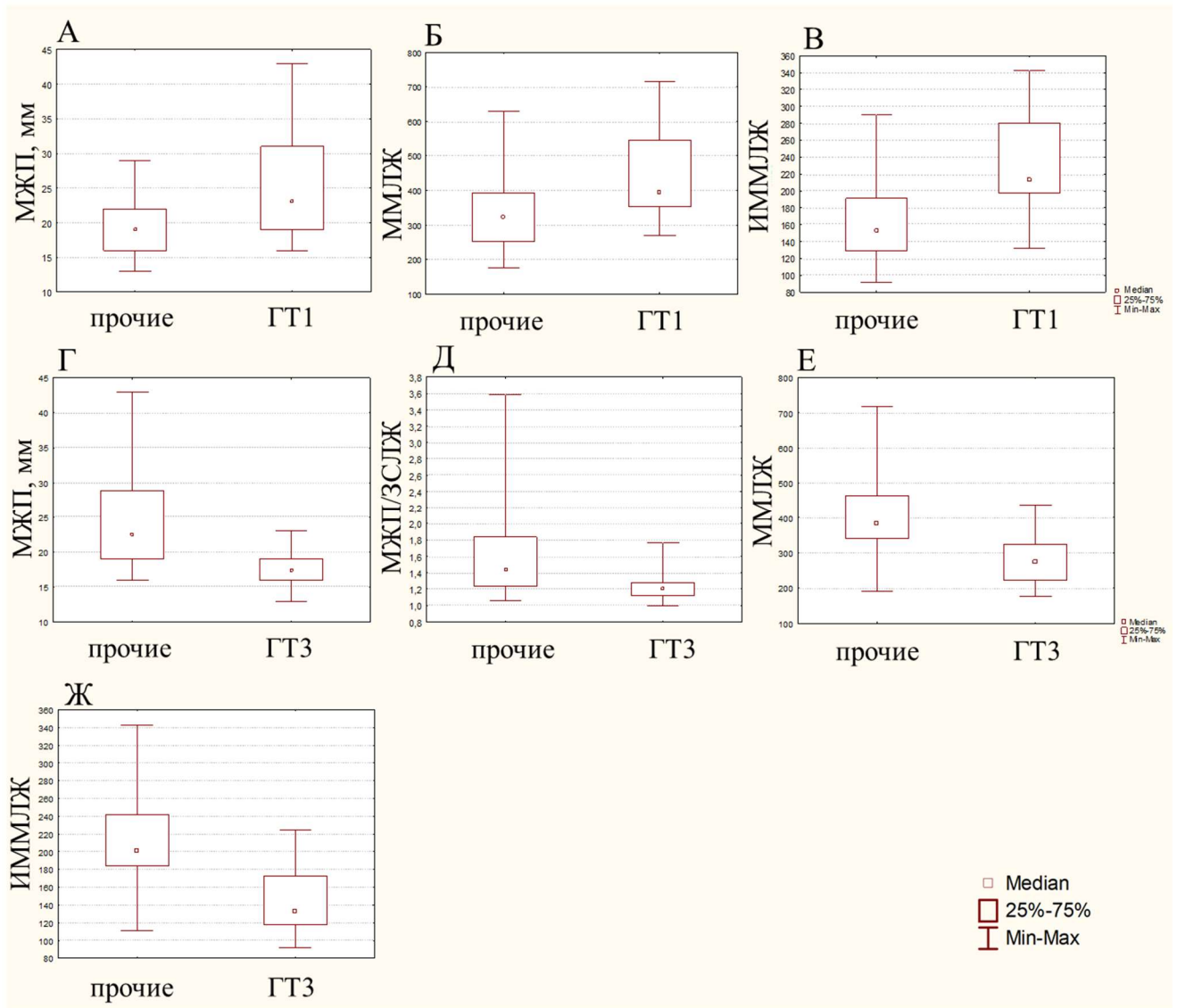


Рисунок 34. Анализ ассоциаций гаплотипов в 3'-UTR гена *TPM1*. А – гаплотипа 1 с толщиной межжелудочковой перегородки (МЖП); Б – гаплотипа 1 с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); В – гаплотипа 1 с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ); Г – гаплотипа 3 с толщиной МЖП; Д – гаплотипа 3 с отношением толщины межжелудочковой перегородки к толщине задней стенки левого желудочка (МЖП/ЗСЛЖ); Е – гаплотипа 3 с ММЛЖ; Ж – гаплотипа 3 с ИММЛЖ.

Присутствие в генотипе пациента гаплотипа 2' ассоциировано с более низкими показателями ММЛЖ ($p=0,0124$) и ИММЛЖ ($p=0,0155$) по сравнению с остальными генотипами (Рисунок 35 Д, Е). Гаплотип 3', наоборот, ассоциирован с более высокими показателями ММЛЖ ($p=0,0410$) и ИММЛЖ ($p=0,0215$), а также с меньшими значениями ФВ ($p=0,0331$) (Рисунок 35 Ж-И).

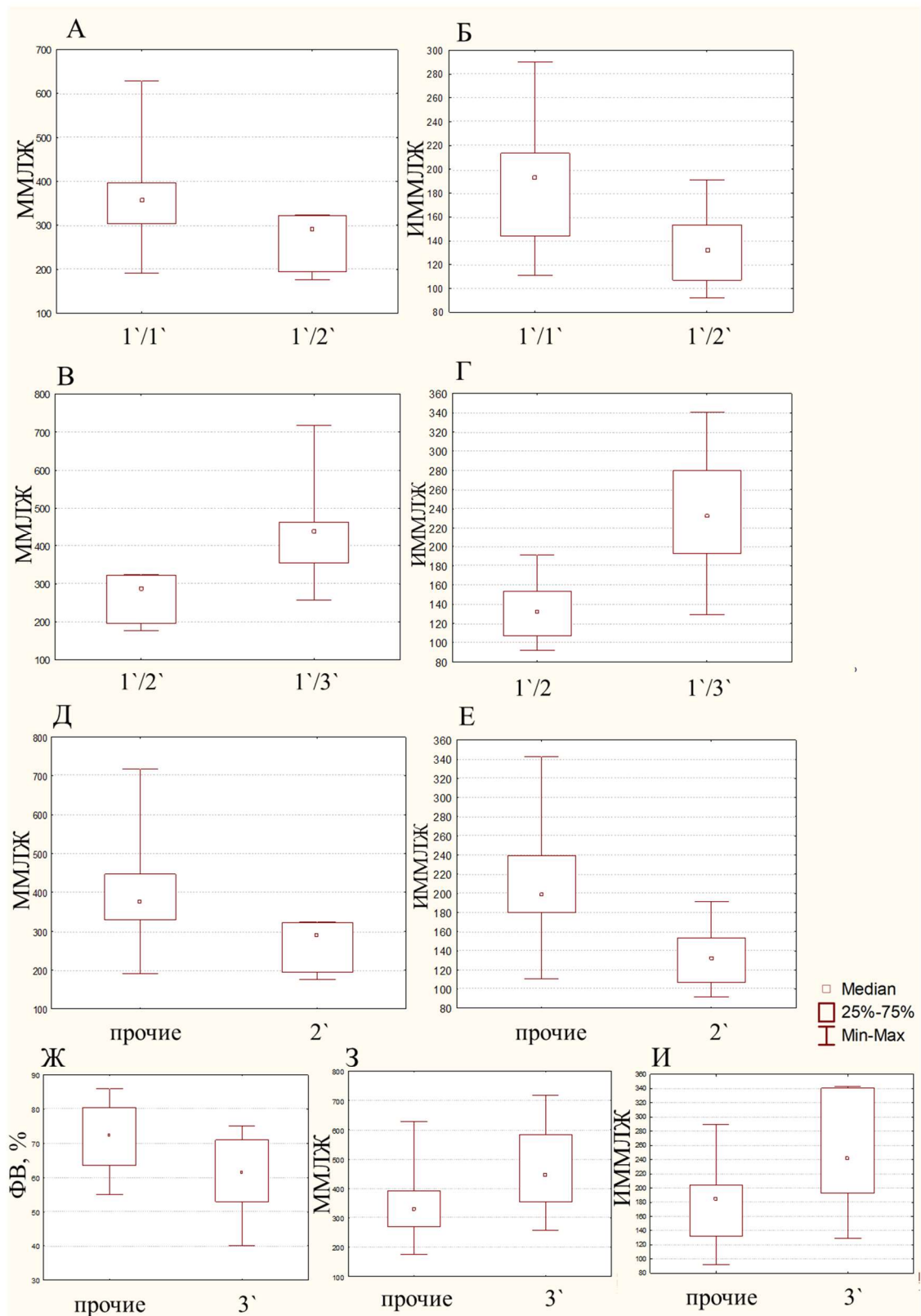


Рисунок 35. Анализ ассоциаций гаплотипов в области гена антисмысловой РНК во втором интроне гена *TRM1*. Гаплотипов 1'2' и 1'1': А – с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); Б – с индексом массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ); гаплотипов 1'2' и 1'3': В – с ММЛЖ; Г – с ИММЛЖ; гаплотипа 2': Д – с ММЛЖ; Е – ИММЛЖ; гаплотипа 3': Ж – с фракцией выброса (ФВ); З – с массой миокарда левого желудочка (ММЛЖ); И – ИММЛЖ.

Ассоциация гаплотипа 2' с ИММЛЖ соответствует результатам анализа отдельных SNP (rs66793829 ассоциирован с ИММЛЖ). Так же и второй полиморфизм (rs3803499), образующий гаплотип 3', был ассоциирован с более низкими значениями фракции выброса при анализе отдельных SNP. При анализе гаплотипов для этого варианта добавляется ассоциация с более высокими значениями ММЛЖ и ИММЛЖ. Следует отметить, что этот же вариант входит и в гаплотип 2', однако там он не проявляет такого эффекта. Вариант rs66793829 является более редким и выявлен нами всегда вместе с rs3803499. Возможно, rs66793829, обладая «благоприятным» эффектом в отношении гипертрофии миокарда (более низкие значения по сравнению с референсной последовательностью), может компенсировать «неблагоприятный» эффект rs3803499 (более выраженная гипертрофия).

Что касается сцепления друг с другом гаплотипов в двух регионах гена *TPM1*, то гаплотип 2' второго интрона чаще наблюдается на одной цепи (в цис-положении) с гаплотипом 3 в 3'-UTR, а гаплотип 3' второго интрона - в цис-положении с гаплотипом 1 в 3'UTR. Характер и направленность ассоциаций совпадает (3' и 1 - более выраженная гипертрофия, 2' и 3 – менее выраженная). Вместе с тем эти два региона все же относятся к разным блокам сцепления. Следовательно, сложно сделать вывод о том, какие именно SNP в этих гаплотипах функционально значимы для гипертрофии миокарда и сократительной функции сердца. Кроме того, учитывая довольно малый объем выборки, необходимы дальнейшие исследования для уточнения этой зависимости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования оценена нуклеотидная изменчивость полной последовательности пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*) у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с компенсаторной гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии. Особенность нашего подхода к секвенированию анализируемых генов заключается в амплификации перекрывающихся длинных продуктов ПЦР (максимальная длина около 9 тысяч п.н.), которые захватывают промоторную область, экзоны, интроны и 3'-UTR. Ампликоны объединяли в эквимоллярных количествах, затем штрих-кодировали и секвенировали, а данные обрабатывали с помощью биоинформатического анализа. Исследование проведено с применением как массового параллельного секвенирования, так и нового метода секвенирования третьего поколения - нанопорового (мономолекулярного) секвенирования, который позволяет получать прочтения отдельных молекул длиной до нескольких тысяч пар нуклеотидов. Для подтверждения выявленных клинически значимых генетических вариантов использовалось секвенирование по Сэнгеру.

Точная классификация генетических вариантов с точки зрения их патогенности имеет важное клиническое значение — для прогноза течения заболевания у пробанда, а также профилактики передачи такого варианта потомкам при пренатальной и предимплантационной диагностике. В нашем исследовании идентифицированные генетические варианты в выборках пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, были классифицированы по степени патогенности с учетом критериев ACMG [Richards S. et al., 2015; Рыжкова О.П. и др., 2019; <http://calc.generesearch.ru/>; <https://varsome.com/>] и специализированных для кардиомиопатий рекомендаций [Elliott P.M. et al., 2014; Ommen S.R. et al., 2020].

В результате у 26% (20 из 77) пациентов с гипертрофической кардиомиопатией были обнаружены клинически значимые варианты III–V класса патогенности (патогенные, вероятно патогенные и с неопределенным значением). В отличие от них, у пациентов с компенсаторной гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии (n=13) не выявлено клинически значимых генетических вариантов, и обнаружены только редкие (с частотой в популяциях менее 1%) варианты I–II класса патогенности (доброкачественные и вероятно доброкачественные).

Наибольшее количество клинически значимых вариантов было локализовано в генах *MYBPC3* и *MYH7* (44% и 38% соответственно), а в генах *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* обнаружено по одному вероятно патогенному варианту. По типу 81% идентифицированных генетических вариантов представляли собой миссенс-замены, в то же время нонсенс мутации, делеция одной аминокислоты и сдвиг рамки считывания встречались реже. Пять клинически значимых генетических вариантов в генах *MYBPC3* и *MYH7* ранее не были описаны в литературе.

Все варианты, обнаруженные у пациентов с ГКМП, были единичными случаями в исследованной выборке, за исключением с.C3697T (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* и с.G2609A (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7*, которые выявлены у четырех и двух пациентов соответственно. Данные результаты в целом согласуются с имеющимися публикациями по этому вопросу [Ommen S.R. et al., 2020; Hathaway J., Heliö K. et al., 2021]

В нашей работе для анализа нуклеотидной изменчивости генов саркомерных белков в выборках пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, впервые использовалась технология мономолекулярного секвенирования. Мы провели сравнение качества секвенирования одних и тех же продуктов ПЦР пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*), полученных от 4 пациентов с гипертрофической кардиомиопатией, с помощью Oxford

Nanopore Technologies и Illumina, для оценки возможности его использования в молекулярно-генетической диагностике гипертрофической кардиомиопатии. Анализ результатов секвенирования показал, что для прямого мономолекулярного секвенирования характерна более высокая частота ошибок (6,86–6,92%), чем для технологии Illumina (1,14–1,35%). Кроме того, секвенирование Oxford Nanopore Technologies выявило гораздо большее количество коротких делеций и инсерций по сравнению с секвенированием Illumina. Более того, несоответствие двух методов касалось и однонуклеотидных вариантов с наибольшим числом различий среди гомополимерных последовательностей и областей, содержащих tandemные повторы. Ошибки отмечены также при определении генотипов отдельных генетических вариантов: алгоритмы Oxford Nanopore Technologies определяли гетерозигот как гомозигот, в том числе это касалось патогенных вариантов – с.C3697T (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3*.

В последнее время по мере накопления данных секвенирования генов ГКМП становится понятно, что пациенты с более чем одним патогенным вариантом не так уж редки [Zou Y. et al., 2013; Alfares A. A. et al. 2015; Дземешкевич С.Л. и др., 2019]. Например, сочетание патогенных вариантов p.Arg787His и p.Ile736Thr в гене *MYH7* приводило к тяжелой форме ГКМП [Laredo R. et al., 2006]. Интересно, что у пробандов со сложными компаунд-гетерозиготами в гене *MYH7* регистрировали более высокую массу миокарда левого желудочка и более высокие амплитуды QRS, SV1 и RV5 + SV1 на ЭКГ, чем у тех, у кого были моноаллельные двойные мутации [Wang B. et al. 2019]. Более того, Zou Y. с соавторами [Zou Y. et al., 2013;] на основании изучения мутаций в генах *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2* и *TNNI3* заключили, что ни конкретный ген, ни конкретная мутация не коррелировали с клиническим фенотипом ГКМП, тогда как количество мутаций было связано с максимальной толщиной стенки левого желудочка; множественные патогенные варианты (как в одном и том же, так и в разных генах саркомерных белков) зарегистрированы у 9,5% пациентов с ГКМП.

В нашей работе с помощью прямого нанопорового секвенирования длинных фрагментов ДНК были проанализированы два клинически значимых варианта (с.3613G>A (p.Glu1205Lys) и с.4259G>A (p.Arg1420Gln)) в гене *MYH7* у пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии. Причем в родословной данной семьи было несколько случаев внезапной сердечной смерти. Было установлено, что данные варианты находятся в цис-положении (на одном аллеле), что может иметь значение для медико-генетического консультирования.

Таким образом, результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что на данный момент времени для рутинной молекулярно-генетической диагностики больше подходят методы секвенирования «второго поколения». Однако технология мономолекулярного секвенирования имеет потенциал для диагностики ГКМП, особенно в случае выявления двух и более потенциально патогенных вариантов в одном из анализируемых генов саркомерных белков для прямого определения гаплотипов (определение цис- или транс-положения вариантов).

Интронная изменчивость генов гипертрофической кардиомиопатии и ее возможная функциональная значимость являются нечастым предметом исследования. Известно, что значительная часть (до 10%) мутаций при кардиомиопатии – это мутации, нарушающие сайты сплайсинга [Salman O.F. et al., 2018]. Однако кроме канонических сайтов сплайсинга, мутации в интронах могут затрагивать сайты связывания факторов транскрипции, CpG-сайты (эпигенетическая регуляция активности генов), активировать криптические сайты сплайсинга. Кроме того, известно, например, что в интронах гена *MYH7* расположен ген микроРНК (*MIR208B*), а также ген длинной некодирующей РНК, являющейся важным фактором реакции миокарда на стресс [Pan P. Et al., 2014]. Также было показано, что интронные варианты, расположенные на значительном удалении от экзонов, могут усиливать проявление патогенных мутаций в других генах, т. е. являются, по сути, вторыми мутациями [Mendes de Almeida R. et al., 2017].

В нашем исследовании в результате мономолекулярного секвенирования образцов ДНК пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, были получены результаты по структуре гаплотипов, образованных выявленными вариантами в генах саркомерных белков. Показано, что для генов *TNNT2* и *TPM1* характерно наличие гаплотипов, в которые входят несколько сцепленных между собой потенциально функциональных некодирующих вариантов.

В частности, в гене *TNNT2* выявлен частый гаплотип, образованный семью вариантами (интронные – rs1104859, rs1892027, rs10920184, rs4915240, rs45533739, rs947485, и синонимичный вариант p.Ile116Ile (rs3729547)), которые могут влиять на сплайсинг данного гена в миокарде. Причем ранее три интронных варианта - rs10920184 (интрон 5), rs1892027 и rs1104859 (оба интрон 12), входящих в состав двух распространенных у пациентов гаплотипов, были ассоциированы с морфологическими и функциональными параметрами сердца в работах GWAS [van der Harst P. et al., 2016; Meyer H.V. et al., 2020; Verweij N. et al., 2020].

Анализ структуры неравновесия по сцеплению и частоты встречаемости гаплотипов в гене *TPM1* показывает, что в регуляторных участках гена, в том числе во 2м интроне и в 3'-нетранслируемом регионе, существуют устойчивые гаплотипы, образованные аллелями нескольких частых SNP с вероятным функциональным значением.

Первый «блок сцепления» состоит из 5 полиморфизмов (rs8026502, rs57645645, rs73431508, rs4075047 и rs111470259), расположенных в области, кодирующей антисмысловую РНК *asTPM1* во втором интроне гена. В этой области находится альтернативный промотор *TPM1*, CpG-островок, энхансерные последовательности. Варианты rs73431508, rs4075047 и rs111470259, согласно онлайн-ресурсу ADAstra, являются сайтами связывания целого ряда транскрипционных факторов, один из которых - Stat1 - ингибирует гипертрофию миокарда у мыши путем подавления активности генов гипертрофии и фиброза, но

стимуляции деления митохондрий и усиления их функции в кардиомиоцитах [Zhen C. et al., 2021].

Второй «блок сцепления» образован полиморфизмами rs11636549, rs707602 и rs7178040, которые расположены в 3'-некодирующем регионе гена *TPM1*, так же, как и rs8519 и rs6738, однако альтернативные аллели для rs11636549, rs707602 и rs7178040, с одной стороны, и rs8519 вместе с rs6738, с другой стороны, находятся на разных гаплотипах.

Вариант rs8519 расположен близко к консервативным сайтам «сидового» региона miR-183-5p.2, miR-96-5p и miR-1271-5p, а другой полиморфизм 3'UTR rs707602 – miR-29-3p. Кроме того, другие SNP анализируемого локуса (rs6738 и rs7178040) потенциально могут нарушать связывание широкого спектра микроРНК и мРНК *TPM1*, согласно базе данных miRNASNP-v3 [<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/miRNASNP/#!/>]. Кроме того, биоинформатически предсказано, что замена rs8519 A>G может изменять вторичную структуру мРНК *TPM1*, а также влиять на стабильность мРНК, по-видимому, контролируя этот процесс опосредованно через РНК-связывающие белки (MSI1, PRR3, HNRNPH1, RBM28 и SRSF10). Эти факты подчеркивают актуальность детального изучения роли широкого спектра РНК-связывающих белков в регуляции альтернативного сплайсинга гена *TPM1* в кардиомиоцитах.

Существование таких «устойчивых» гаплотипов в генах *TNNT2* и *TPM1* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, может свидетельствовать о действии отбора в пользу или против определенных сочетаний вариантов, что может быть обусловлено внутригенными эпистатическими эффектами.

Накопление, а затем обобщение данных по фенотипической вариабельности клинической картины у носителей отдельных патогенных мутаций позволит в дальнейшем более точно определять условия пенетрантности таких вариантов и прогнозировать особенности течения болезни, что, в свою очередь, будет

способствовать улучшению помощи, оказываемой пациентом с данной патологией.

В нашей работе на примере двух вариантов с.C3697T (rs397516037, p.Gln1233Ter) в гене *MYBPC3* и с.G2609A (rs36211715, p.Arg870His) в гене *MYH7* был проведен анализ изменчивости клинических показателей у их носителей, как в нашей выборке, так и в имеющихся публикациях. Показано, что у носителей одного и того же патогенного варианта может регистрироваться широкий диапазон клинических симптомов гипертрофической кардиомиопатии, а также другие формы кардиомиопатии (некомпактный миокард, аритмогенная кардиомиопатия). Это подчеркивает важность идентификации и изучения дополнительных факторов, как генетических, так и эпигенетических, которые, наряду с факторами внешней среды, могут выступать в качестве модификаторов клинического фенотипа у носителей патогенных вариантов при наследственных кардиомиопатиях.

В группе пациентов с гипертрофической кардиомиопатией был проведен анализ ассоциаций частых генетических вариантов и образованных ими гаплотипов пяти генов саркомерных белков (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TRPM1*) с клинически значимыми количественными признаками (возраст манифестации заболевания, эхокардиографические оценки гипертрофии миокарда, фракции выброса и градиента давления в выходящем тракте левого желудочка). Результаты анализа показывают, что полиморфизм генов саркомерных белков вносит вклад в формирование фенотипа заболевания – главным образом, в отношении степени гипертрофии миокарда (толщина межжелудочковой перегородки, индекс массы миокарда левого желудочка) и характеристики сократительной функции сердца (фракция выброса левого желудочка). Кроме того, для варианта rs11671293 гена *TNNI3* выявлена ассоциация с возрастом манифестации заболевания в подгруппе пациентов с поздним началом болезни (после 30 лет).

Проведение анализа ассоциаций для гаплотипов, объединяющих частые варианты, генов *TNNT2* и *TPM1* показало, что в некоторых случаях эффект обусловлен взаимодействием сцепленных между собой вариантов. Так, наиболее частый гаплотип *TNNT2* ассоциирован с фракцией выброса левого желудочка, хотя ни один из отдельных вариантов, образующих этот гаплотип, не показал такой ассоциации. Еще один пример – ассоциация редкого аллеля rs3803499 гена *TPM1* с более низкой фракцией выброса при анализе отдельных вариантов и дополнительно с более высокими значениями ММЛЖ и ИММЛЖ при анализе гаплотипов во втором интроне: эти ассоциации статистически значимы для гаплотипа 3' (только вариант rs3803499), но не выявляются для гаплотипа 2' (rs3803499 в сочетании с rs66793829).

В то время как поиск генетических вариантов, модифицирующих проявление и течение гипертрофической кардиомиопатии, является предметом исследования на протяжении многих лет, и подобные исследования были проведены как с помощью кандидатного подхода, так и с помощью GWAS, принципиально новым в данной работе является исследование модифицирующего эффекта гаплотипов в генах саркомерных белков, в том числе образованных вариантами в некодирующих регионах, которые могут влиять на сплайсинг, на экспрессию гена на различных уровнях, а также на регуляцию активности других генов. Выявленные ассоциации позволяют утверждать, что такой эффект есть, однако с учетом небольшого объема выборки данный вопрос требует дальнейших исследований.

Таким образом, в диссертационной работе получены принципиально новые данные о том, что изменчивость в генах саркомерных белков может оказывать эффект на фенотип гипертрофии миокарда различного генеза – гипертрофической кардиомиопатии и гипертрофии при артериальной гипертензии. Наш опыт свидетельствует о том, что технология секвенирования третьего поколения представляет значительный интерес с точки зрения разработки панелей целевых генов для диагностики наследственных заболеваний. Возможность прямого

определения протяженных гаплотипов, а также быстрое развитие инструментов анализа данных делают эту технологию перспективной для применения в диагностике наследственных заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. У 26% пациентов с гипертрофической кардиомиопатией выявлены клинически значимые (патогенные, вероятно патогенные и варианты неясного значения) генетические варианты, из которых большинство являлось миссенс-заменами (81%) и было локализовано в генах *MYBPC3* и *MYH7* (44% и 38% соответственно). В то же время, у пациентов с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, не обнаружено клинически значимых генетических вариантов.

2. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, идентифицирован протяженный гаплотип в гене *TNNT2*, образованный потенциально функционально значимыми вариантами (rs1104859, rs3729547, rs4915240 и rs947485), и сцепленный с SNP (rs1104859, rs1892027, rs10920184), ранее ассоциированными с аномалиями трабекул и ЭКГ-показателями гипертрофии миокарда по результатам GWAS.

3. У пациентов с гипертрофической кардиомиопатией и с гипертрофией левого желудочка, как следствия артериальной гипертензии, выявлены гаплотипы в гене *TPM1*, включающие потенциально значимые варианты. Гаплотип, образованный альтернативными аллелями rs8026502, rs73431508, rs4075047, rs57645645 и rs111470259, расположен в области интрона 2, обогащенной регуляторными элементами. В регионе 3'-UTR в транс-положении по отношению друг к другу локализованы два гаплотипа, составленные из потенциально функционально значимых вариантов rs8519 и rs6738, а также rs11636549, rs707602 и rs7178040.

4. У пациента с семейной формой гипертрофической кардиомиопатии установлено цис-положение клинически значимых генетических вариантов (с.4259G>A (rs397516207, p.Arg1420Gln) и с.3613G>A (rs727505026, p.Glu1205Lys)), расположенных на расстоянии 2,4 Кб друг от друга, в гене *MYH7* с помощью мономолекулярного секвенирования.

5. Обнаружена связь вариантов в некодирующих участках исследованных генов с изменчивостью клинически значимых показателей при гипертрофической кардиомиопатии. В частности, аллель «Т» (генотип ТТ) rs7159367 в интроне 29 *MYH7*, аллель «D» (генотип DD) rs45533739 в интроне 3 *TNNT2*, аллель «G» (генотип GG) rs8519 в 3'-UTR и аллель «G» (генотип GG) rs66793829 в интроне 2 *TPM1* ассоциированы с большей выраженностью гипертрофии миокарда. Аллель «С» (генотип ТС+СС) rs3803499 в интроне 2 *TPM1*, аллель «Т» (генотип ТТ) rs7159367 в интроне 29 *MYH7* и аллель «С» (генотип СС+ТС) rs11671293 в интроне 1 *TNNI3* ассоциированы с меньшими значениями фракции выброса левого желудочка. Аллель «С» (генотип СС+ТС) rs11671293 в интроне 1 *TNNI3* также связан с более ранним возрастом начала заболевания в группе пациентов старше 30 лет.

6. Выявлены ассоциации гаплотипов, образованных изученными вариантами генов *TNNT2* и *TPM1* с изменчивостью эхокардиографических показателей у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией. В частности, гомозиготность по наиболее частому гаплотипу *TNNT2* (rs1104859, rs1892027, rs3729547, rs10920184, rs4915240, rs45533739, rs947485) ассоциирована с меньшими значениями фракции выброса левого желудочка; гаплотип, образованный «альтернативными» аллелями rs8519 и rs6738 в 3'-UTR *TPM1*, а также сцепленный с ним гаплотип в интроне 2 *TPM1* (rs66793829, rs9803499) ассоциированы с более высокими значениями массы миокарда и индекса массы миокарда левого желудочка.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

АД - аутосомно-доминантный

АР - аутосомно-рецессивный

ВТЛЖ - выносящий тракт левого желудочка

ГД - градиент давления

ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия

ГЛЖ - гипертрофия левого желудочка

ДКМП - дилатационная кардиомиопатия

ЗСЛЖ – задняя стенка левого желудочка

ИБС - ишемическая болезнь сердца

ИММЛЖ – индекс массы миокарда левого желудочка

ЛЖ - левый желудочек

МЖП – межжелудочковая перегородка

ММЛЖ – масса миокарда левого желудочка

РКМП - рестриктивная кардиомиопатия

ФВ – фракция выброса левого желудочка

ЭхоКГ - эхокардиографическое исследование

АСС - (от англ. American College of Cardiology) - Американская Коллегия Кардиологов

ACMG - (от англ. American College of Medical Genetics) - Американская Коллегия Медицинской Генетики

АНА - (от англ. American Heart Association) - Американская Ассоциация Сердца

AMP - (от англ. Association for Molecular Pathology) - Ассоциация Молекулярной патологии

сMyBP-C - (от англ. Cardiac Myosin-Binding Protein C) - сердечная изоформа миозин связывающего белка

dbSNP – (от англ. Single Nucleotide Polymorphism Database) – база данных генетических вариантов

ESC - (от англ. European Society of Cardiology) - Европейское Сообщество Кардиологии

eQTL – (от англ. expression quantitative trait loci) – генетические варианты, ассоциированные с изменением экспрессии гена

GnomAD - (от англ. The Genome Aggregation Database) - база данных агрегированных геномов

GWAS – (от англ. Genome-wide association studies) – полногеномное ассоциативное исследование

ID – (от англ. identifier) - идентификатор

МНС-β - (от англ. Myosin Heavy Chain Beta) - тяжелая цепь β миозина

MLC - (от англ. Myosin Light Chain) - легкая цепь миозина

SNV - (от англ. Single Nucleotide Variant) – однонуклеотидный вариант

sQTL – (от англ. Splicing Quantitative Trait Loci) – генетические варианты, ассоциированные с изменением сплайсинга гена

TnC - (от англ. Troponin C) - тропонин C

TnI - (от англ. Troponin I) - тропонин I

TnT - (от англ. Troponin T) - тропонин T

TPM - (от англ. Tropomyosin) - тропомиозин

VUS – (от англ. Variant of Uncertain Significance) – вариант неопределенного значения

WGS - (от англ. Whole Genome Sequencing) - полногеномное секвенирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баулина Н. М. и др. Гипертрофическая кардиомиопатия как олигогенное заболевание: аргументы транскриптомики // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – Гипертрофическая кардиомиопатия как олигогенное заболевание. – № 6. – С. 955-967.
2. Брагина Е. Ю. и др. Генетическая канва герменевтики феномена сочетания болезней человека // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2023. – Т. 27, № 1. – С. 7-17.
3. Буйкин С. В. и др. Анализ ассоциаций популяционного полиморфизма митохондриальной ДНК с функциональными показателями сердечно-сосудистой системы в тувинской популяции // Медицинская генетика. – 2005. – Т. 4, № 4. – С. 60.
4. Вахрушев Ю. А. и др. Спектр непатогенных вариантов в гене тайтина и генах внутри- и внесаркомерного цитоскелета (*TTN*, *MYBPC3*, *FLNC*, *RBM20*) у пациентов с различными вариантами кардиомиопатий // Трансляционная медицина. – 2022. – Т. 9, № 2. – С. 37-49.
5. Голубенко М. В. и др. Изменчивость гена *MYH7* при гипертрофической кардиомиопатии: ассоциация SNP с фенотипом // Медицинская Генетика. – 2002. – Т. 1. – № 1. – С. 42-44.
6. Дземешкевич С. Л. и др. Гипертрофическая кардиомиопатия у молодых: фенотип, генотип и варианты лечебной тактики // Текст : электронный. – 2019. – Гипертрофическая кардиомиопатия у молодых. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/gipertroficheskaya-kardiomiopatiya-u-molodyh-fenotip-genotip-i-varianty-lechebnoi-taktiki/pdf> (дата обращения: 24.07.2023).
7. Дземешкевич С. Л. и др. Профилактика внезапной сердечной смерти у больного с диффузно-генерализованной гипертрофической кардиомиопатией, обусловленной двумя мутациями в генах *MYH7* и *MYBPC3* // Текст : электронный. – 2018. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/profilaktika-vnezapnoy-serdechnoy->

smerti-u-bolnogo-s-diffuzno-generalizovannoy-gipertroficheskoy-kardiomiopatiey-obuslovlennoy/pdf (дата обращения: 24.07.2023).

8. Заключенская Е. В. и др. Генетическое разнообразие сердечно-сосудистых заболеваний и возможности молекулярной диагностики // Вестник аритмологии. – 2005. – № 37. – С. 69-76.

9. Затеищikov, Д. А. и др. Молекулярная кардиология: от расшифровки генетической природы и механизмов развития заболевания до внедрения в клиническую практику // Терапевтический архив. – 2022. – Т. 94, № 4. – С. 463-466.

10. Иванова А. А. и др. Исследование ассоциации с внезапной сердечной смертью однонуклеотидных полиморфизмов rs1008832 гена CACNA1C, rs4027402 гена SYNE2, rs2340917 гена TMEM43, rs58225473 гена CACNB2 // Атеросклероз. – 2022. – Т. 18, № 1. – С. 38-45.

11. Комиссарова С. М., и др. Гипертрофическая кардиомиопатия: анализ связи генотипа и фенотипа у пациентов с высоким риском внезапной смерти // Медицинская Генетика. – 2018. – Т. 17. – № 11. – С. 34-42.

12. Костарева А. А. и др. Молекулярно-генетические аспекты и особенности клинического течения некоторых форм гипертрофической кардиомиопатии // Вестник аритмологии. – 2003. – № 32. – С. 57-61

13. Кучер А. Н. и др. Патогенетика кардиомиопатий // Генетика. – 2023. – Т. 59, № 6. – С. 615-632.

14. Леднев П. В. и др. Гипертрофическая кардиомиопатия: современное состояние проблемы // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2019. – № 1. – С. 83-88.

15. Макеева О. А. Структурно-функциональная организация наследственной компоненты подверженности к гипертрофии миокарда у человека. [Текст]: дис. ... канд. мед. наук: 03.00.15: защищена 19.10.04 // Макеева О. А. - М., 2004. - 178 с.

16. Никулина С. Ю. и др. Ассоциация полиморфизма гена SCN5A с дилатационной кардиомиопатией // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2021. – Т. 17, № 4. – С. 564-569.
17. Ниязова С. С. и др. Mutation spectrum in sarcomeric protein genes and their phenotypic features in Belarusian patients with hypertrophic cardiomyopathy // Nauchno-prakticheskii zhurnal «Medicinskaia genetika». – 2019. – № 6(). – С. 21-33.
18. Ниязова С. С. и др. Мутации в генах *MYH7*, *MYBPC* у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией в Республике Беларусь // Молекулярная медицина. – 2014. – Т. 3. – С. 45-50.
19. Пузырев В. П. Генетические основы коморбидности у человека // Генетика. – 2015. – Т. 51, № 4. – С. 491.
20. Рыжкова О. П. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2) // Nauchno-prakticheskii zhurnal «Medicinskaia genetika». – 2020. – № 2(). – С. 3-23.
21. Салахов Р.Р. и др. Опыт молекулярно-генетической диагностики гипертрофической кардиомиопатии с использованием нанопорового секвенирования ДНК // – 2021. – Т. 26. – № 10. – С. 36-41.
22. Стрельцова А. А. и др. Полиморфный вариант rs1739843 гена белка теплового шока 7 (*HSPB7*) и его связь с вариантами клинического течения и исходами у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией (результаты 10-летнего наблюдения) // Российский кардиологический журнал. – 2019. – Т. 24. – № 10. – С. 7-15.
23. Чакова Н. Н. и др. Мутации в генах ионных каналов при гипертрофической кардиомиопатии // Текст: электронный. – 2019. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/mutatsii-v-genah-ionnyh-kanalov-pri-gipertroficheskoi-kardiomiopatii/pdf> (дата обращения: 24.07.2023).

24. Шестак А.Г. и др. Представленность явления "выпадения" аллеля в результатах секвенирования // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21, № 10. – С. 65-68.
25. Шляхто Е.В. и др. Первичные кардиомиопатии, современное представление // Терапевтический архив. – 2005. – Т. 77, № 12. – С. 77-83.
26. Alfares A. A. et al. Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: expanded panels offer limited additional sensitivity // Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics. – 2015. – Т. 17. – Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy. – № 11. – P. 880-888.
27. Al-Khelaifi F. et al. Genome-Wide Association Study Reveals a Novel Association Between *MYBPC3* Gene Polymorphism, Endurance Athlete Status, Aerobic Capacity and Steroid Metabolism // Frontiers in Genetics. – 2020. – V. 11. – P. 595.
28. Ameer A., Kloosterman W. P., Hestand M. S. Single-molecule sequencing: towards clinical applications // Trends in Biotechnology. – 2019. – V. 37. – Single-Molecule Sequencing. – № 1. – P. 72-85.
29. Anan R., Shono H., Tei C. Novel cardiac beta-myosin heavy chain gene missense mutations (R869C and R870C) that cause familial hypertrophic cardiomyopathy // Human Mutation. – 2000. – V. 15. – № 6. – P. 584.
30. Andreassen C. et al. New population-based exome data are questioning the pathogenicity of previously cardiomyopathy-associated genetic variants // European journal of human genetics: EJHG. – 2013. – V. 21. – № 9. – P. 918-928.
31. Andreeva S. et al. Case report: two new cases of autosomal-recessive hypertrophic cardiomyopathy associated with *TRIM63*-compound heterozygous variant // Frontiers in Genetics. – 2022. – V. 13. – Case Report. – P. 743472.
32. Antoniutti G. et al. Genotype-phenotype correlation in hypertrophic cardiomyopathy: new variant p.Arg652Lys in *MYH7* // Genes. – 2022. – V. 13. – Genotype-Phenotype Correlation in Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 2. – P. 320.

33. Appari M. et al. C1q-TNF-Related Protein-9 Promotes Cardiac Hypertrophy and Failure // *Circulation Research*. – 2017. – V. 120. – № 1. – P. 66-77.
34. Arad M., Seidman J. G., Seidman C. E. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy // *Human Molecular Genetics*. – 2002. – V. 11. – № 20. – P. 2499-2506.
35. Arányi T. et al. The BiSearch web server // *BMC bioinformatics*. – 2006. – V. 7. – P. 431.
36. Bagnall R. D. et al. Whole genome sequencing improves outcomes of genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2018. – V. 72. – № 4. – P. 419-429.
37. Bahrudin U. et al. Ubiquitin-proteasome system impairment caused by a missense cardiac myosin-binding protein C mutation and associated with cardiac dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Molecular Biology*. – 2008. – V. 384. – № 4. – P. 896-907.
38. Barbitoff Y. A. et al. Expanding the Russian allele frequency reference via cross-laboratory data integration: insights from 7,452 exome samples // *Genetic and Genomic Medicine*, 2021. – URL: <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.11.02.21265801> (date accessed: 24.07.2023). – Text : electronic.
39. Barrett J. C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2005. – V. 21. – Haploview. – № 2. – P. 263-265.
40. Bashyam M. D. et al. A p.R870H mutation in the beta-cardiac myosin heavy chain 7 gene causes familial hypertrophic cardiomyopathy in several members of an Indian family // *The Canadian Journal of Cardiology*. – 2007. – V. 23. – № 10. – P. 788-790.
41. Basit H., Brito D., Sharma S. Hypertrophic Cardiomyopathy Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023. // StatPearls. – Treasure Island (FL) :

StatPearls Publishing, 2023. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430788/> (дата обращения: 24.07.2023).

42. Berge K. E., Leren T. P. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy in Norway // *Clinical Genetics*. – 2014. – V. 86. – № 4. – P. 355-360.

43. Bick A. G. et al. Burden of rare sarcomere gene variants in the Framingham and Jackson Heart Study cohorts // *American Journal of Human Genetics*. – 2012. – V. 91. – № 3. – P. 513-519.

44. Blagova O. et al. Different Phenotypes of Sarcomeric *MYBPC3*-Cardiomyopathy in the Same Family: Hypertrophic, Left Ventricular Noncompaction and Restrictive Phenotypes (in Association with Sarcoidosis) // *Genes*. – 2022. – V. 13. – Different Phenotypes of Sarcomeric *MYBPC3*-Cardiomyopathy in the Same Family. – № 8. – P. 1344.

45. Blair D. R. et al. A nondegenerate code of deleterious variants in Mendelian loci contributes to complex disease risk // *Cell*. – 2013. – V. 155. – № 1. – P. 70-80.

46. Blair E. et al. Mutations in *cis* can confound genotype-phenotype correlations in hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Medical Genetics*. – 2001. – V. 38. – № 6. – C. 385-388.

47. Bortot B. et al. High-throughput genotyping robot-assisted method for mutation detection in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*. – 2011. – V. 20. – № 3. – C. 175-179.

48. Bruin R. G. de et al. Emerging roles for RNA-binding proteins as effectors and regulators of cardiovascular disease // *European Heart Journal*. – 2017. – P. ehw567.

49. Bruter A. V. et al. Super-Enhancers in the Regulation of Gene Transcription: General Aspects and Antitumor Targets // *Acta Naturae*. – 2021. – V. 13. – Super-Enhancers in the Regulation of Gene Transcription. – № 1. – C. 4-15.

50. Buja G. et al. Comparison of QT dispersion in hypertrophic cardiomyopathy between patients with and without ventricular arrhythmias and sudden death // *The American Journal of Cardiology*. – 1993. – V. 72. – № 12. – P. 973-976.
51. Capek P. et al. Hypertrophic cardiomyopathy: from mutation to functional analysis of defective protein // *Croatian Medical Journal*. – 2011. – V. 52. – Hypertrophic cardiomyopathy. – № 3. – P. 384-391.
52. Chakova N.N. et al. Gln1233* nonsense-mutation and Arg326Gln polymorphism of *MYBPC3* gene in patients with hypertrophic cardiomyopathy in Belarus // *Medicinskaia genetika*. – 2018. – V. 17. – № 12. – P. 36-43.
53. Chan F. et al. Subclinical Hypertrophic Cardiomyopathy in Elite Athletes: Knowledge Gaps Persist // *JACC. Case reports*. – 2022. – V. 4. – Subclinical Hypertrophic Cardiomyopathy in Elite Athletes. – № 2. – P. 94-98.
54. Chevers N. Observations on the Diseases of the Orifice and Valves of the Aorta // *Guy's Hospital Reports*. – 1842. – V. 7. – P. 387-392.
55. Chiti E. et al. MicroRNAs in Hypertrophic, Arrhythmogenic and Dilated Cardiomyopathy // *Diagnostics (Basel, Switzerland)*. – 2021. – V. 11. – № 9. – P. 1720.
56. Christian S. et al. Diagnostic validity and clinical utility of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review and meta-analysis // *Open Heart*. – 2022. – V. 9. – Diagnostic validity and clinical utility of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. – № 1. – P. e001815.
57. Chumakova O. S. et al. Advanced searching for hypertrophic cardiomyopathy heritability in real practice tomorrow // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2023. – V. 10. – P. 1236539.
58. Chung H. et al. Differential contributions of sarcomere and mitochondria-related multigene variants to the endophenotype of hypertrophic cardiomyopathy // *Mitochondrion*. – 2020. – V. 53. – P. 48-56.
59. Cirino A. L. et al. A Comparison of Whole Genome Sequencing to Multigene Panel Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients // *Circulation. Cardiovascular Genetics*. – 2017. – V. 10. – № 5. – P. e001768.

60. Coats C. J., Hollman A. Hypertrophic cardiomyopathy: lessons from history // *Heart* (British Cardiac Society). – 2008. – V. 94. – Hypertrophic cardiomyopathy. – № 10. – P. 1258-1263.
61. Correia S. P. et al. Severe congenital lactic acidosis and hypertrophic cardiomyopathy caused by an intronic variant in *NDUFB7* // *Human Mutation*. – 2021. – V. 42. – № 4. – P. 378-384.
62. Coto E. et al. Resequencing the whole *MYH7* gene (including the intronic, promoter, and 3' UTR sequences) in hypertrophic cardiomyopathy // *The Journal of molecular diagnostics: JMD*. – 2012. – V. 14. – № 5. – P. 518-524.
63. Craig R., Lehman W. Crossbridge and tropomyosin positions observed in native, interacting thick and thin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2001. – V. 311. – № 5. – P. 1027-1036.
64. Cuda G. et al. The in vitro motility activity of beta-cardiac myosin depends on the nature of the beta-myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 1997. – V. 18. – № 3. – P. 275-283.
65. D'Antonio M. et al. In heart failure reactivation of RNA-binding proteins is associated with the expression of 1,523 fetal-specific isoforms // *PLoS computational biology*. – 2022. – V. 18. – № 2. – P. e1009918.
66. Dainis A. et al. Targeted Long-Read RNA Sequencing Demonstrates Transcriptional Diversity Driven by Splice-Site Variation in *MYBPC3* // *Circulation. Genomic and Precision Medicine*. – 2019. – V. 12. – № 5. – P. e002464.
67. Danecek P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // *GigaScience*. – 2021. – V. 10. – № 2. – P. giab008.
68. Deamer D., Akeson M., Branton D. Three decades of nanopore sequencing // *Nature Biotechnology*. – 2016. – V. 34. – № 5. – P. 518-524.
69. Dementyeva E. V. et al. Applying Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells to Create a Model of Hypertrophic Cardiomyopathy // *Biochemistry (Moscow)*. – 2019. – V. 84. – № 3. – P. 291-298.

70. Dementyeva E. V. et al. Genetic analysis of patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Genes & Cells*. – 2020. – V. 15. – № 3. – P. 68-73.
71. Denz C. R. et al. Expression of a novel cardiac-specific tropomyosin isoform in humans // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 320. – № 4. – P. 1291-1297.
72. Díez-López C., Salazar-Mendiguchía J. Clinical presentations of hypertrophic cardiomyopathy and implications for therapy // *Global Cardiology Science & Practice*. – 2018. – V. 2018. – № 3. – P. 19.
73. Dijk S. J. van, Bezold K. L., Harris S. P. Earning stripes: myosin binding protein-C interactions with actin // *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. – 2014. – V. 466. – Earning stripes. – № 3. – P. 445-450.
74. Dorsch L. M. et al. Protein Quality Control Activation and Microtubule Remodeling in Hypertrophic Cardiomyopathy // *Cells*. – 2019. – V. 8. – № 7. – P. 741.
75. Dumont V., Lehtonen S. PACSIN proteins in vivo: Roles in development and physiology // *Acta Physiologica (Oxford, England)*. – 2022. – V. 234. – PACSIN proteins in vivo. – № 3. – P. e13783.
76. Ecken J. von der et al. Structure of the F-actin-tropomyosin complex // *Nature*. – 2015. – V. 519. – № 7541. – P. 114-117.
77. Ehlermann P. et al. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the *MYBPC3* gene // *BMC medical genetics*. – 2008. – V. 9. – P. 95.
78. Elliott P. M. 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) // *European Heart Journal*. – 2014. – V. 35. – 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy. – № 39. – P. 2733-2779.
79. Enjuto M. et al. Malignant hypertrophic cardiomyopathy caused by the Arg723Gly mutation in beta-myosin heavy chain gene // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2000. – V. 32. – № 12. – P. 2307-2313.

80. Erdmann J. et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Clinical Genetics*. – 2003. – V. 64. – № 4. – P. 339-349.
81. Erdmann J. et al. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2001. – V. 38. – № 2. – P. 322-330.
82. Evans W. Familial cardiomegaly // *British Heart Journal*. – 1949. – V. 11. – № 1. – P. 68-82.
83. Ewels P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2016. – V. 32. – MultiQC. – № 19. – P. 3047-3048.
84. Feria A. E. de, Kott A. E., Becker J. R. Sarcomere mutation negative hypertrophic cardiomyopathy is associated with ageing and obesity // *Open Heart*. – 2021. – V. 8. – № 1. – P. e001560.
85. Ferradini V. et al. Variants in *MHY7* Gene Cause Arrhythmogenic Cardiomyopathy // *Genes*. – 2021. – V. 12. – № 6. – P. 793.
86. Filatova E.V. et al. The p.Arg230His variant of the VCL protein is not pathogenic and does not affect hypertrophic cardiomyopathy phenotype in russian family carrying the p.Gln1233Ter pathogenic variant in the *MYBPC3* gene // *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. – 2021. – V. 12. – P. 1869-1874.
87. Fokstuen S. et al. A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy // *Human Mutation*. – 2008. – V. 29. – № 6. – P. 879-885.
88. Fourey D. et al. Prevalence and Clinical Implication of Double Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy: Revisiting the Gene-Dose Effect // *Circulation: Cardiovascular Genetics*. – 2017. – V. 10. – № 2. – P. e001685.
89. Gabrusenko S. A. et al. 2020 Clinical practice guidelines for Hypertrophic cardiomyopathy // *Russian Journal of Cardiology*. – 2021. – V. 26. – № 5. – P. 4541.

90. García-Castro M. et al. Prevalence and spectrum of mutations in the sarcomeric troponin T and I genes in a cohort of Spanish cardiac hypertrophy patients // *International Journal of Cardiology*. – 2007. – V. 121. – № 1. – P. 115-116.
91. García-Giustiniani D. et al. Phenotype and prognostic correlations of the converter region mutations affecting the β myosin heavy chain // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2015. – V. 101. – № 13. – P. 1047-1053.
92. Garcia-Pavia P. et al. Genetic basis of end-stage hypertrophic cardiomyopathy // *European Journal of Heart Failure*. – 2011. – V. 13. – № 11. – P. 1193-1201.
93. Gati S., Sharma S. Exercise prescription in individuals with hypertrophic cardiomyopathy: what clinicians need to know // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2022. – V. 108. – Exercise prescription in individuals with hypertrophic cardiomyopathy. – № 24. – P. 1930-1937.
94. Ge T. et al. Inhibition of miR-96 enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin by targeting *TPM1* // *Experimental and Therapeutic Medicine*. – 2020. – V. 20. – № 3. – P. 2134-2140.
95. Geisterfer-Lowrance A. A. et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation // *Cell*. – 1990. – V. 62. – A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy. – № 5. – P. 999-1006.
96. Gersh B. J. et al. 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // *Circulation*. – 2011. – V. 124. – 2011 ACCF/AHA guideline for the diagnosis and treatment of hypertrophic cardiomyopathy. – № 24. – P. 2761-2796.
97. Geske J. B., Ommen S. R., Gersh B. J. Hypertrophic Cardiomyopathy: Clinical Update // *JACC. Heart failure*. – 2018. – V. 6. – Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 5. – P. 364-375.

98. Gilbert R. et al. Identification of the A-band localization domain of myosin binding proteins C and H (MyBP-C, MyBP-H) in skeletal muscle // *Journal of Cell Science*. – 1999. – V. 112 (Pt 1). – P. 69-79.
99. Glazier A. A., Thompson A., Day S. M. Allelic imbalance and haploinsufficiency in *MYBPC3*-linked hypertrophic cardiomyopathy // *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. – 2019. – V. 471. – № 5. – P. 781-793.
100. Glotov A. S. et al. Targeted next-generation sequencing (NGS) of nine candidate genes with custom AmpliSeq in patients and a cardiomyopathy risk group // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. – 2015. – V. 446. – P. 132-140.
101. Gomes A. C. et al. Whole-genome DNA sequencing: The key to detecting a sarcomeric mutation in a «false genotype-negative» family with hypertrophic cardiomyopathy // *Revista Portuguesa De Cardiologia*. – 2020. – V. 39. – Whole-genome DNA sequencing. – № 4. – P. 227.e1-227.e9.
102. Gorzynski J. E. et al. Ultra-Rapid Nanopore Whole Genome Genetic Diagnosis of Dilated Cardiomyopathy in an Adolescent With Cardiogenic Shock // *Circulation. Genomic and Precision Medicine*. – 2022. – V. 15. – № 2. – P. e003591.
103. Gray G. A., Gray N. K. A tail of translational regulation // *eLife*. – 2017. – V. 6. – P. e29104.
104. Gruen M., Gautel M. Mutations in beta-myosin S2 that cause familial hypertrophic cardiomyopathy (FHC) abolish the interaction with the regulatory domain of myosin-binding protein-C // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – V. 286. – № 3. – P. 933-949.
105. Guo W. et al. *RBM20*, a gene for hereditary cardiomyopathy, regulates titin splicing // *Nature Medicine*. – 2012. – V. 18. – № 5. – P. 766-773.
106. Harper A. R. et al. Common genetic variants and modifiable risk factors underpin hypertrophic cardiomyopathy susceptibility and expressivity // *Nature Genetics*. – 2021. – V. 53. – № 2. – P. 135-142.

107. Harst P. van der et al. 52 Genetic Loci Influencing Myocardial Mass // Journal of the American College of Cardiology. – 2016. – V. 68. – № 13. – P. 1435-1448.
108. Hartmannova H. et al. Isolated X-linked hypertrophic cardiomyopathy caused by a novel mutation of the four-and-a-half LIM domain 1 gene // Circulation. Cardiovascular Genetics. – 2013. – T. 6. – № 6. – P. 543-551.
109. Hathaway J. et al. Diagnostic yield of genetic testing in a heterogeneous cohort of 1376 HCM patients // BMC cardiovascular disorders. – 2021. – V. 21. – № 1. – P. 126.
110. Helms A. S. et al. Sarcomere mutation-specific expression patterns in human hypertrophic cardiomyopathy // Circulation. Cardiovascular Genetics. – 2014. – V. 7. – № 4. – P. 434-443.
111. Hemerich D. et al. Integrative Functional Annotation of 52 Genetic Loci Influencing Myocardial Mass Identifies Candidate Regulatory Variants and Target Genes // Circulation. Genomic and Precision Medicine. – 2019. – V. 12. – № 2. – P. e002328.
112. Henderson C. A. et al. Overview of the Muscle Cytoskeleton // Comprehensive Physiology. – 2017. – V. 7. – № 3. – P. 891-944.
113. Henderson C. A., Gregorio C. C. Dynamics of Actin in the Heart: Defining Thin Filament Length // Cardiac Cytoarchitecture / ed. E. Ehler. – Cham: Springer International Publishing, 2015. – Dynamics of Actin in the Heart. – P. 71-88. – URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-15263-9_4 (date accessed: 24.07.2023).
114. Hershberger R. E. et al. Genetic Evaluation of Cardiomyopathy-A Heart Failure Society of America Practice Guideline // Journal of Cardiac Failure. – 2018. – V. 24. – № 5. – P. 281-302.
115. Hershkovitz T. et al. Clinical diversity of *MYH7*-related cardiomyopathies: Insights into genotype-phenotype correlations // American Journal of Medical Genetics. Part A. – 2019. – V. 179. – Clinical diversity of *MYH7*-related cardiomyopathies. – № 3. – P. 365-372.

116. Hirota T. et al. A novel cardiac myosin-binding protein C S297X mutation in hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Cardiology*. – 2010. – V. 56. – № 1. – P. 59-65.
117. Hitchcock-DeGregori S. E. Tropomyosin: function follows structure // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2008. – V. 644. – Tropomyosin. – P. 60-72.
118. Holmes K. C. The swinging lever-arm hypothesis of muscle contraction // *Current biology: CB*. – 1997. – V. 7. – № 2. – P. R112-118.
119. Homburger J. R. et al. Multidimensional structure-function relationships in human β -cardiac myosin from population-scale genetic variation // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2016. – V. 113. – № 24. – P. 6701-6706.
120. Hu X. et al. RNA-binding protein CELF1 promotes cardiac hypertrophy via interaction with PEBP1 in cardiomyocytes // *Cell and Tissue Research*. – 2022. – V. 387. – № 1. – P. 111-121.
121. Huang G.-W. et al. Natural antisense transcript *TPMI*-AS regulates the alternative splicing of tropomyosin I through an interaction with RNA-binding motif protein 4 // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2017. – V. 90. – P. 59-67.
122. Huang H. et al. The MicroRNA MiR-29c Alleviates Renal Fibrosis via *TPMI*-Mediated Suppression of the Wnt/ β -Catenin Pathway // *Frontiers in Physiology*. – 2020. – V. 11. – P. 331.
123. Huang H.-Y. et al. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – V. 50. – miRTarBase update 2022. – № D1. – P. D222-D230.
124. Huxley H. E. The crossbridge mechanism of muscular contraction and its implications // *The Journal of Experimental Biology*. – 1985. – V. 115. – P. 17-30.
125. Inchingolo A. V. et al. Revealing the mechanism of how cardiac myosin-binding protein C N-terminal fragments sensitize thin filaments for myosin binding //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2019. – V. 116. – № 14. – P. 6828-6835.

126. Ingles J. et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling // Journal of Medical Genetics. – 2005. – V. 42. – Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy. – № 10. – P. e59.

127. Ingles J. et al. Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes // Circulation. Genomic and Precision Medicine. – 2019. – V. 12. – № 2. – P. e002460.

128. Ingles J. et al. Nonfamilial Hypertrophic Cardiomyopathy: Prevalence, Natural History, and Clinical Implications // Circulation. Cardiovascular Genetics. – 2017. – V. 10. – Nonfamilial Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 2. – P. e001620.

129. Jaganathan K. et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning // Cell. – 2019. – V. 176. – № 3. – P. 535-548.e24.

130. Janssens J. V. et al. Cardiac troponins may be irreversibly modified by glycation: novel potential mechanisms of cardiac performance modulation // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – Cardiac troponins may be irreversibly modified by glycation. – № 1. – P. 16084.

131. Jarcho J. A. et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1 // The New England Journal of Medicine. – 1989. – V. 321. – № 20. – P. 1372-1378.

132. Juang J.-M. J. et al. Fabry disease cardiac variant IVS4+919 G>A is associated with multiple cardiac gene variants in patients with severe cardiomyopathy and fatal arrhythmia // Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics. – 2019. – V. 21. – № 8. – P. 1890-1891.

133. Jumper J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. – 2021. – V. 596. – № 7873. – P. 583-589.

134. Kampourakis T. et al. Myosin binding protein-C activates thin filaments and inhibits thick filaments in heart muscle cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2014. – V. 111. – № 52. – P. 18763-18768.
135. Kapplinger J. D. et al. Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy-associated mutations from background genetic noise // *Journal of Cardiovascular Translational Research*. – 2014. – V. 7. – № 3. – P. 347-361.
136. Karczewski K. J. et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans // *Nature*. – 2020. – V. 581. – № 7809. – P. 434-443.
137. Kaski J. P. et al. Prevalence of sarcomere protein gene mutations in preadolescent children with hypertrophic cardiomyopathy // *Circulation. Cardiovascular Genetics*. – 2009. – V. 2. – № 5. – P. 436-441.
138. Keckesova Z. et al. LACTB is a tumour suppressor that modulates lipid metabolism and cell state // *Nature*. – 2017. – V. 543. – № 7647. – P. 681-686.
139. Khurshid S. et al. Clinical and genetic associations of deep learning-derived cardiac magnetic resonance-based left ventricular mass // *Nature Communications*. – 2023. – V. 14. – № 1. – P. 1558.
140. Knöll R. Myosin binding protein C: implications for signal-transduction // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2012. – V. 33. – Myosin binding protein C. – № 1. – P. 31-42.
141. Koelemen J. et al. RBM20-Related Cardiomyopathy: Current Understanding and Future Options // *Journal of Clinical Medicine*. – 2021. – V. 10. – RBM20-Related Cardiomyopathy. – № 18. – P. 4101.
142. Köhler J. et al. Mutation of the myosin converter domain alters cross-bridge elasticity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – V. 99. – № 6. – P. 3557-3562.
143. Kolokotronis K. et al. Biallelic mutation in *MYH7* and *MYBPC3* leads to severe cardiomyopathy with left ventricular noncompaction phenotype // *Human Mutation*. – 2019. – V. 40. – № 8. – P. 1101-1114.

144. Komamura K. et al. The role of a common *TNNT2* polymorphism in cardiac hypertrophy // *Journal of Human Genetics*. – 2004. – V. 49. – № 3. – P. 129-133.
145. Kopanos C. et al. VarSome: the human genomic variant search engine // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2019. – V. 35. – VarSome. – № 11. – P. 1978-1980.
146. Kopylova G. V. et al. Cardiomyopathy-associated mutations in tropomyosin differently affect actin-myosin interaction at single-molecule and ensemble levels // *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. – 2019. – V. 40. – № 3-4. – P. 299-308.
147. Kubo T. et al. Genetic screening and double mutation in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. – 2011. – V. 75. – № 11. – P. 2654-2659.
148. Kumar S. et al. Role of common sarcomeric gene polymorphisms in genetic susceptibility to left ventricular dysfunction // *Journal of Genetics*. – 2016. – V. 95. – № 2. – P. 263-272.
149. Kwon J. J. et al. A Systematic Review of miR-29 in Cancer // *Molecular Therapy Oncolytics*. – 2019. – V. 12. – P. 173-194.
150. Lahrouchi N. et al. Utility of Post-Mortem Genetic Testing in Cases of Sudden Arrhythmic Death Syndrome // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2017. – V. 69. – № 17. – P. 2134-2145.
151. Laredo R. et al. Beta-myosin heavy-chain gene mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Revista Espanola De Cardiologia*. – 2006. – V. 59. – № 10. – P. 1008-1018.
152. Lehman W. et al. Tropomyosin and actin isoforms modulate the localization of tropomyosin strands on actin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – V. 302. – № 3. – P. 593-606.

153. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences // Bioinformatics (Oxford, England). – 2018. – V. 34. – Minimap2. – № 18. – P. 3094-3100.
154. Li L. et al. A Potential Oligogenic Etiology of Hypertrophic Cardiomyopathy: A Classic Single-Gene Disorder // Circulation Research. – 2017. – V. 120. – A Potential Oligogenic Etiology of Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 7. – P. 1084-1090.
155. Li Q. et al. Unraveling synonymous and deep intronic variants causing aberrant splicing in two genetically undiagnosed epilepsy families // BMC medical genomics. – 2021. – V. 14. – № 1. – P. 152.
156. Li S. et al. The miR-183 Cluster: Biogenesis, Functions, and Cell Communication via Exosomes in Cancer // Cells. – 2023. – V. 12. – The miR-183 Cluster. – № 9. – P. 1315.
157. Li X. et al. *TNNT2* gene polymorphisms are associated with susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy in the Han Chinese population // BioMed Research International. – 2013. – V. 2013. – P. 201372.
158. Li Y. D. et al. Significance of sarcomere gene mutation in patients with dilated cardiomyopathy // Genetics and molecular research: GMR. – 2015. – V. 14. – № 3. – P. 11200-11210.
159. Liew A. C. et al. Hypertrophic Cardiomyopathy-Past, Present and Future // Journal of Clinical Medicine. – 2017. – V. 6. – № 12. – P. 118.
160. Liu C.-J. et al. miRNASNP-v3: a comprehensive database for SNPs and disease-related variations in miRNAs and miRNA targets // Nucleic Acids Research. – 2021. – V. 49. – miRNASNP-v3. – № D1. – P. D1276-D1281.
161. Liu M. et al. C1q/TNF-related protein-9 promotes macrophage polarization and improves cardiac dysfunction after myocardial infarction // Journal of Cellular Physiology. – 2019. – V. 234. – № 10. – P. 18731-18747.

162. Liu W. et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy // *The American Journal of Cardiology*. – 2013. – V. 112. – № 4. – P. 585-589.
163. Upregulation of SPI1 during myocardial infarction aggravates cardiac tissue injury and disease progression through activation of the TLR4/NFκB axis // *American Journal of Translational Research*. – 2022. – V. 14. – № 4. – P. 2709-2727.
164. Landrum M. J. et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – V. 46. – ClinVar. – № D1. – P. D1062-D1067.
165. Lopes L. R. et al. Genetic complexity in hypertrophic cardiomyopathy revealed by high-throughput sequencing // *Journal of Medical Genetics*. – 2013. – V. 50. – № 4. – P. 228-239.
166. Lopes L. R. et al. Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2015. – V. 101. – № 4. – P. 294-301.
167. Luther P. K., Craig R. Modulation of striated muscle contraction by binding of myosin binding protein C to actin // *BioArchitecture*. – 2011. – V. 1. – № 6. – P. 277-283.
168. Mademont-Soler I. et al. Additional value of screening for minor genes and copy number variants in hypertrophic cardiomyopathy // *PloS One*. – 2017. – V. 12. – № 8. – P. e0181465.
169. Manrai A. K. et al. Genetic Misdiagnoses and the Potential for Health Disparities // *The New England Journal of Medicine*. – 2016. – V. 375. – № 7. – P. 655-665.
170. Marian A. J. Challenges in the Diagnosis of Anderson-Fabry Disease: A Deceptively Simple and Yet Complicated Genetic Disease // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2016. – V. 68. – Challenges in the Diagnosis of Anderson-Fabry Disease. – № 10. – P. 1051-1053.

171. Marian A. J., Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy // *Circulation Research*. – 2017. – V. 121. – Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 7. – P. 749-770.
172. Maron B. J. et al. Demographics and Epidemiology of Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: From the United States National Registry // *The American Journal of Medicine*. – 2016. – V. 129. – Demographics and Epidemiology of Sudden Deaths in Young Competitive Athletes. – № 11. – P. 1170-1177.
173. Maron B. J. et al. Diagnosis and Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy: JACC State-of-the-Art Review // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2022. – V. 79. – Diagnosis and Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 4. – P. 372-389.
174. Maron B. J. et al. Moving Beyond the Sarcomere to Explain Heterogeneity in Hypertrophic Cardiomyopathy: JACC Review Topic of the Week // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2019. – V. 73. – Moving Beyond the Sarcomere to Explain Heterogeneity in Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 15. – P. 1978-1986.
175. Maron B. J., Maron M. S. Hypertrophic cardiomyopathy // *Lancet* (London, England). – 2013. – V. 381. – № 9862. – P. 242-255.
176. Maron B. J., Maron M. S., Semsarian C. Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors // *Heart Rhythm*. – 2012. – V. 9. – Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy. – № 1. – P. 57-63.
177. Maron B. J., Maron M. S., Semsarian C. Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2012. – V. 60. – Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years. – № 8. – P. 705-715.
178. Maron B. J., Rowin E. J., Maron M. S. Hypertrophic Cardiomyopathy: New Concepts and Therapies // *Annual Review of Medicine*. – 2022. – V. 73. – Hypertrophic Cardiomyopathy. – P. 363-375.

179. Marsiglia J. D. C. et al. Screening of *MYH7*, *MYBPC3*, and *TNNT2* genes in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy // *American Heart Journal*. – 2013. – V. 166. – № 4. – P. 775-782.
180. Marston S. et al. Evidence from human myectomy samples that *MYBPC3* mutations cause hypertrophic cardiomyopathy through haploinsufficiency // *Circulation Research*. – 2009. – V. 105. – № 3. – P. 219-222.
181. Massera D. et al. How common is hypertrophic cardiomyopathy... really?: Disease prevalence revisited 27 years after CARDIA // *International Journal of Cardiology*. – 2023. – V. 382. – How common is hypertrophic cardiomyopathy... really? – P. 64-67.
182. Mazzarotto F. et al. Contemporary Insights Into the Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy: Toward a New Era in Clinical Testing? // *Journal of the American Heart Association*. – 2020. – V. 9. – Contemporary Insights Into the Genetics of Hypertrophic Cardiomyopathy. – № 8. – P. e015473.
183. McLeod C. J. et al. Outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy and a normal electrocardiogram // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2009. – V. 54. – № 3. – P. 229-233.
184. Mendes de Almeida R. et al. Whole gene sequencing identifies deep-intronic variants with potential functional impact in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *PloS One*. – 2017. – V. 12. – № 8. – P. e0182946.
185. Meyer H. V. et al. Genetic and functional insights into the fractal structure of the heart // *Nature*. – 2020. – V. 584. – № 7822. – P. 589-594.
186. Millat G. et al. Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy // *European Journal of Medical Genetics*. – 2011. – V. 54. – № 6. – P. e570-575.
187. Minervini C. F. et al. Nanopore Sequencing in Blood Diseases: A Wide Range of Opportunities // *Frontiers in Genetics*. – 2020. – V. 11. – Nanopore Sequencing in Blood Diseases. – P. 76.

188. Moody W. E., Elliott P. M. Changing concepts in heart muscle disease: the evolving understanding of hypertrophic cardiomyopathy // *Heart* (British Cardiac Society). – 2022. – V. 108. – Changing concepts in heart muscle disease. – № 10. – P. 768-773.
189. Mori A. A. et al. Association of variants in *MYH7*, *MYBPC3* and *TNNT2* with sudden cardiac death-related risk factors in Brazilian patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Forensic Science International. Genetics*. – 2021. – V. 52. – P. 102478.
190. Mouton J. M. et al. MYBPH acts as modifier of cardiac hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy (HCM) patients // *Human Genetics*. – 2016. – V. 135. – № 5. – P. 477-483.
191. Muresan I. D., Agoston-Coldea L. Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy: genetics, clinics, and modular imaging // *Heart Failure Reviews*. – 2021. – V. 26. – Phenotypes of hypertrophic cardiomyopathy. – № 5. – P. 1023-1036.
192. Nakashima Y. et al. Lifelong clinical impact of the presence of sarcomere gene mutation in japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. – 2020. – V. 84. – № 10. – P. 1846-1853.
193. Nishi H. et al. A myosin missense mutation, not a null allele, causes familial hypertrophic cardiomyopathy // *Circulation*. – 1995. – V. 91. – № 12. – P. 2911-2915.
194. O'Hare B. J. et al. Patients with hypertrophic cardiomyopathy deemed genotype negative based on research grade genetic analysis: time for repeat diagnostic testing with next-generation sequencing // *Circulation. Genomic and Precision Medicine*. – 2020. – V. 13. – Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy Deemed Genotype Negative Based on Research Grade Genetic Analysis. – № 6. – P. e003013.
195. Okonechnikov K. et al. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2012. – V. 28. – Unipro UGENE. – № 8. – P. 1166-1167.

196. Okonechnikov K., Conesa A., García-Alcalde F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data // *Bioinformatics* (Oxford, England). – 2016. – V. 32. – Qualimap 2. – № 2. – P. 292-294.
197. Ommen S. R. et al. 2020 AHA/ACC guideline for the diagnosis and treatment of patients with hypertrophic cardiomyopathy: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association joint committee on clinical practice guidelines // *Circulation*. – 2020. – V. 142. – 2020 AHA/ACC guideline for the diagnosis and treatment of patients with hypertrophic cardiomyopathy. – № 25. – P. e558-e631.
198. Orzechowski M. et al. Tropomyosin movement on F-actin during muscle activation explained by energy landscapes // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2014. – V. 545. – P. 63-68.
199. Österberg A. W. et al. High ECG Risk-Scores Predict Late Gadolinium Enhancement on Magnetic Resonance Imaging in HCM in the Young // *Pediatric Cardiology*. – 2021. – V. 42. – № 3. – P. 492-500.
200. Otsuka H. et al. Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy // *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*. – 2012. – V. 76. – № 2. – P. 453-461.
201. Pan S. et al. Cardiac structural and sarcomere genes associated with cardiomyopathy exhibit marked intolerance of genetic variation // *Circulation. Cardiovascular Genetics*. – 2012. – V. 5. – № 6. – P. 602-610.
202. Pare J. A. et al. Hereditary cardiovascular dysplasia. A form of familial cardiomyopathy // *The American Journal of Medicine*. – 1961. – V. 31. – P. 37-62.
203. Payne A. et al. Readfish enables targeted nanopore sequencing of gigabase-sized genomes // *Nature Biotechnology*. – 2021. – V. 39. – № 4. – P. 442-450.
204. Pelechano V., Steinmetz L. M. Gene regulation by antisense transcription // *Nature Reviews. Genetics*. – 2013. – V. 14. – № 12. – P. 880-893.

205. Pérez-Palma E. et al. Simple ClinVar: an interactive web server to explore and retrieve gene and disease variants aggregated in ClinVar database // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – V. 47. – Simple ClinVar. – № W1. – P. W99-W105.
206. Pieleś G. E. et al. Association between genetic variants in the HIF1A-VEGF pathway and left ventricular regional myocardial deformation in patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Pediatric Research*. – 2021. – V. 89. – № 3. – P. 628-635.
207. Pirani A. et al. An atomic model of the thin filament in the relaxed and Ca²⁺-activated states // *Journal of Molecular Biology*. – 2006. – V. 357. – № 3. – P. 707-717.
208. Pommié C. et al. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties // *Journal of molecular recognition: JMR*. – 2004. – V. 17. – № 1. – P. 17-32.
209. Popa-Fotea N. M. et al. Exploring the Continuum of Hypertrophic Cardiomyopathy-From DNA to Clinical Expression // *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. – 2019. – V. 55. – № 6. – P. 299.
210. Puckelwartz M. J. et al. Genomic Context Differs Between Human Dilated Cardiomyopathy and Hypertrophic Cardiomyopathy // *Journal of the American Heart Association*. – 2021. – V. 10. – № 7. – P. e019944.
211. Puusepp S. et al. Effectiveness of whole exome sequencing in unsolved patients with a clinical suspicion of a mitochondrial disorder in Estonia // *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. – 2018. – V. 15. – P. 80-89.
212. Puzyrev K.V. et al. A single nucleotide polymorphism in exon 24 of the *MYH7* gene may be associated with left ventricular hypertrophy in essential hypertension and with left ventricular outflow obstruction in hypertrophic cardiomyopathy // *European Journal of Human Genetics*. – 2002. – V. 10, No. S1. – P. 78.

213. Rai T. S. et al. Genotype phenotype correlations of cardiac beta-myosin heavy chain mutations in Indian patients with hypertrophic and dilated cardiomyopathy // *Molecular and Cellular Biochemistry*. – 2009. – V. 321. – № 1-2. – P. 189-196.
214. Rajan S. et al. Molecular and functional characterization of a novel cardiac-specific human tropomyosin isoform // *Circulation*. – 2010. – V. 121. – № 3. – P. 410-418.
215. Rang F. J., Kloosterman W. P., Ridder J. de From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy // *Genome Biology*. – 2018. – V. 19. – From squiggle to basepair. – № 1. – P. 90.
216. Ratti J. et al. Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0: cardiac-specific regulation of myosin at its neck? // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – Structure and interactions of myosin-binding protein C domain C0. – № 14. – P. 12650-12658.
217. Rayes R. F. et al. Dynamics of Tropomyosin in Muscle Fibers as Monitored by Saturation Transfer EPR of Bi-Functional Probe // *PLoS ONE*. – 2011. – V. 6. – № 6. – P. e21277.
218. Rayment I. et al. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1995. – V. 92. – № 9. – P. 3864-3868.
219. Rayment I. et al. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor // *Science*. – 1993. – V. 261. – Three-dimensional structure of myosin subfragment-1. – № 5117. – P. 50-58.
220. Rentzsch P. et al. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores // *Genome Medicine*. – 2021. – V. 13. – № 1. – P. 31.
221. Repetti G. G. et al. Discordant clinical features of identical hypertrophic cardiomyopathy twins // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – V. 118. – № 10. – P. e2021717118.

222. Richards S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. – 2015. – V. 17. – Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants. – № 5. – P. 405-424.

223. Ripoll-Vera T. et al. Clinical and Prognostic Profiles of Cardiomyopathies Caused by Mutations in the Troponin T Gene // *Revista Espanola De Cardiologia (English Ed.)*. – 2016. – V. 69. – № 2. – P. 149-158.

224. Rodríguez-García M. I. et al. Screening mutations in myosin binding protein C3 gene in a cohort of patients with Hypertrophic Cardiomyopathy // *BMC medical genetics*. – 2010. – V. 11. – P. 67.

225. Roncarati R. et al. Unexpectedly low mutation rates in beta-myosin heavy chain and cardiac myosin binding protein genes in Italian patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Cellular Physiology*. – 2011. – V. 226. – № 11. – P. 2894-2900.

226. Rowin E. J. et al. Interaction of Adverse Disease Related Pathways in Hypertrophic Cardiomyopathy // *The American Journal of Cardiology*. – 2017. – V. 120. – № 12. – P. 2256-2264.

227. Ruppel K. M., Spudich J. A. Structure-function analysis of the motor domain of myosin // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 1996. – V. 12. – № 1. – P. 543-573.

228. Rysev N. A. et al. The effect of the Asp175Asn and Glu180Gly *TPMI* mutations on actin-myosin interaction during the ATPase cycle // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 2012. – V. 1824. – № 2. – P. 366-373.

229. Sadayappan S. et al. Cardiac myosin binding protein c phosphorylation is cardioprotective // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – № 45. – P. 16918-16923.

230. Saini H. et al. Pathophysiology of Cardiomyopathies // Cellular and Molecular Pathobiology of Cardiovascular Disease. – Elsevier, 2014. – P. 101-119. – URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124052062000065> (date accessed: 24.07.2023).

231. Salakhov R. R. et al. Application of Long-Read Nanopore Sequencing to the Search for Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – № 24. – P. 15845.

232. Salakhov R.R. et al. Sequencing of cardiomyopathy genes in patients with hypertrophic cardiomyopathy reveals enrichment for rare variants in the genes for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // Proceedings of the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference. – 2021. – Virtual.

233. Salman O. F. et al. Inherited Cardiomyopathies and the Role of Mutations in Non-coding Regions of the Genome // Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2018. – V. 5. – P. 77.

234. Sanchez O. et al. Natural and Undetermined Sudden Death: Value of Post-Mortem Genetic Investigation // PloS One. – 2016. – V. 11. – Natural and Undetermined Sudden Death. – № 12. – P. e0167358.

235. Santos S. et al. High resolution melting: improvements in the genetic diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese cohort // BMC medical genetics. – 2012. – V. 13. – High resolution melting. – P. 17.

236. Schmincke A. Ueber linkseitige muskulöse Conusstenosen // DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift. – 1907. – V. 33. – № 50. – P. 2082-2083.

237. Sdvigova N. A. et al. The urgency of genetic verification of non-compaction cardiomyopathy in children: clinical cases // Current pediatrics. – 2018. – V. 17. – № 2. – P. 157-165.

238. Sedaghat-Hamedani F. et al. Clinical outcomes associated with sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a meta-analysis on 7675 individuals // Clinical Research in Cardiology: Official Journal of the German Cardiac Society. –

2018. – V. 107. – Clinical outcomes associated with sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy. – № 1. – P. 30-41.

239. Seebohm B. et al. Cardiomyopathy mutations reveal variable region of myosin converter as major element of cross-bridge compliance // *Biophysical Journal*. – 2009. – V. 97. – № 3. – P. 806-824.

240. Seemann E. et al. Deciphering caveolar functions by syndapin III KO-mediated impairment of caveolar invagination // *eLife*. – 2017. – V. 6. – P. e29854.

241. Sellers J. R. Myosins: a diverse superfamily // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2000. – V. 1496. – Myosins. – № 1. – P. 3-22.

242. Sevirieva I. et al. Regulatory domain of troponin moves dynamically during activation of cardiac muscle // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2014. – V. 75. – P. 181-187.

243. Sewanan L. R. et al. Predicting Effects of Tropomyosin Mutations on Cardiac Muscle Contraction through Myofilament Modeling // *Frontiers in Physiology*. – 2016. – V. 7. – P. 473.

244. Sheikh F., Lyon R. C., Chen J. Getting the skinny on thick filament regulation in cardiac muscle biology and disease // *Trends in Cardiovascular Medicine*. – 2014. – V. 24. – № 4. – P. 133-141.

245. Shestak A. G. et al. Allelic Dropout Is a Common Phenomenon That Reduces the Diagnostic Yield of PCR-Based Sequencing of Targeted Gene Panels // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – V. 12. – P. 620337.

246. Shibata A. et al. IntSplice: prediction of the splicing consequences of intronic single-nucleotide variations in the human genome // *Journal of Human Genetics*. – 2016. – V. 61. – IntSplice. – № 7. – P. 633-640.

247. Shimizu M. et al. Chronologic electrocardiographic changes in patients with hypertrophic cardiomyopathy associated with cardiac troponin 1 mutation // *American Heart Journal*. – 2002. – V. 143. – № 2. – P. 289-293.

248. Simpson J. T. et al. Detecting DNA cytosine methylation using nanopore sequencing // *Nature Methods*. – 2017. – V. 14. – № 4. – P. 407-410.

249. Sousa A. et al. Molecular characterization of Portuguese patients with dilated cardiomyopathy // *Revista Portuguesa De Cardiologia*. – 2019. – V. 38. – № 2. – P. 129-139.
250. Stevanovski I. et al. Comprehensive genetic diagnosis of tandem repeat expansion disorders with programmable targeted nanopore sequencing // *Science Advances*. – 2022. – V. 8. – № 9. – P. eabm5386.
251. Sweeney H. L. et al. Functional analyses of troponin T mutations that cause hypertrophic cardiomyopathy: insights into disease pathogenesis and troponin function // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – V. 95. – Functional analyses of troponin T mutations that cause hypertrophic cardiomyopathy. – № 24. – P. 14406-14410.
252. Sweeney H. L., Houdusse A. Structural and Functional Insights into the Myosin Motor Mechanism // *Annual Review of Biophysics*. – 2010. – V. 39. – № 1. – P. 539-557.
253. Takahashi-Yanaga F., Ohtsuki I., Morimoto S. Effects of troponin T mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy on regulatory functions of other troponin subunits // *Journal of Biochemistry*. – 2001. – V. 130. – № 1. – P. 127-131.
254. Takeda J.-I. et al. IntSplice2: Prediction of the Splicing Effects of Intronic Single-Nucleotide Variants Using LightGBM Modeling // *Frontiers in Genetics*. – 2021. – V. 12. – IntSplice2. – P. 701076.
255. Tanjore R. R. et al. Genotype-phenotype correlation of R870H mutation in hypertrophic cardiomyopathy // *Clinical Genetics*. – 2006. – V. 69. – № 5. – P. 434-436.
256. Tardiff J. C. Tropomyosin and dilated cardiomyopathy: revenge of the actinomyosin «gatekeeper» // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2010. – V. 55. – Tropomyosin and dilated cardiomyopathy. – № 4. – P. 330-332.
257. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults // *British Heart Journal*. – 1958. – V. 20. – № 1. – P. 1-8.
258. Thakkar K. et al. Sudden cardiac death in childhood hypertrophic cardiomyopathy // *Disease-a-month: DM*. – 2023. – V. 69. – № 4. – P. 101548.

259. Tóth T. et al. The Gln1233ter mutation of the myosin binding protein C gene: causative mutation or innocent polymorphism in patients with hypertrophic cardiomyopathy? // *International Journal of Cardiology*. – 2011. – V. 153. – The Gln1233ter mutation of the myosin binding protein C gene. – № 2. – P. 216-219.
260. Uchiyama K. et al. Impact of QT variables on clinical outcome of genotyped hypertrophic cardiomyopathy // *Annals of Noninvasive Electrocardiology: The Official Journal of the International Society for Holter and Noninvasive Electrocardiology, Inc.* – 2009. – V. 14. – № 1. – P. 65-71.
261. Van Driest S. L. 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. – V. 106. – № 24. – P. 3085-3090.
262. Varadi M. et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models // *Nucleic Acids Research*. – 2022. – V. 50. – AlphaFold Protein Structure Database. – № D1. – P. D439-D444.
263. Verweij N. et al. The Genetic Makeup of the Electrocardiogram // *Cell Systems*. – 2020. – V. 11. – № 3. – P. 229-238.e5.
264. Vester S. K. et al. Nucleolin acts as the receptor for C1QTNF4 and supports C1QTNF4-mediated innate immunity modulation // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100513.
265. Waldmüller S. et al. Array-based resequencing assay for mutations causing hypertrophic cardiomyopathy // *Clinical Chemistry*. – 2008. – V. 54. – № 4. – P. 682-687.
266. Waldmüller S. et al. Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network Heart Failure // *European Journal of Heart Failure*. – 2011. – V. 13. – Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. – № 11. – P. 1185-1192.

267. Waldmüller S. et al. Novel deletions in *MYH7* and *MYBPC3* identified in Indian families with familial hypertrophic cardiomyopathy // *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. – 2003. – V. 35. – № 6. – P. 623-636.
268. Walsh R. et al. Defining the genetic architecture of hypertrophic cardiomyopathy: re-evaluating the role of non-sarcomeric genes // *European Heart Journal*. – 2017. – V. 38. – Defining the genetic architecture of hypertrophic cardiomyopathy. – № 46. – P. 3461-3468.
269. Walsh R. et al. Minor hypertrophic cardiomyopathy genes, major insights into the genetics of cardiomyopathies // *Nature Reviews. Cardiology*. – 2022. – V. 19. – № 3. – P. 151-167.
270. Walsh R. et al. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. – 2017. – V. 19. – № 2. – P. 192-203.
271. Wang B. et al. Genetic analysis of monoallelic double *MYH7* mutations responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy // *Molecular Medicine Reports*. – 2019. – V. 20. – № 6. – P. 5229-5238.
272. Wang J. et al. Malignant effects of multiple rare variants in sarcomere genes on the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy // *European Journal of Heart Failure*. – 2014. – V. 16. – № 9. – P. 950-957.
273. Wang K., Li M., Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data // *Nucleic Acids Research*. – 2010. – V. 38. – ANNOVAR. – № 16. – P. e164.
274. Wang S. et al. Worse prognosis with gene mutations of beta-myosin heavy chain than myosin-binding protein C in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy // *Clinical Cardiology*. – 2008. – V. 31. – № 3. – P. 114-118.
275. Watkins H. et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy // *The New England Journal of Medicine*. – 1995. – V. 332. – № 16. – P. 1058-1064.

276. Watkins H., Ashrafian H., McKenna W. J. The genetics of hypertrophic cardiomyopathy: Teare redux // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2008. – V. 94. – The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. – № 10. – P. 1264-1268.
277. Wegner A. Kinetic analysis of actin assembly suggests that tropomyosin inhibits spontaneous fragmentation of actin filaments // *Journal of Molecular Biology*. – 1982. – V. 161. – № 2. – P. 217-227.
278. Wernicke D. et al. Autonomic cardiac control in animal models of cardiovascular diseases II. Variability analysis in transgenic rats with alpha-tropomyosin mutations Asp175Asn and Glu180Gly // *Biomedizinische Technik. Biomedical Engineering*. – 2007. – V. 52. – № 1. – P. 50-55.
279. Whiffin N. et al. Using high-resolution variant frequencies to empower clinical genome interpretation // *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*. – 2017. – V. 19. – № 10. – P. 1151-1158.
280. Woo A. et al. Mutations of the beta myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy: critical functional sites determine prognosis // *Heart (British Cardiac Society)*. – 2003. – V. 89. – Mutations of the beta myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy. – № 10. – P. 1179-1185.
281. Wood K. A. et al. Pathogenic Intronic Splice-Affecting Variants in *MYBPC3* in Three Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy // *Cardiogenetics*. – 2021. – V. 11. – № 2. – P. 73-83.
282. Xu F. et al. Characterizing modifier genes of cardiac fibrosis phenotype in hypertrophic cardiomyopathy // *International Journal of Cardiology*. – 2021. – V. 330. – P. 135-141.
283. Yang P.-Y. et al. Down-regulation of miR-29c promotes the progression of oral submucous fibrosis through targeting tropomyosin-1 // *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*. – 2022. – V. 121. – № 6. – P. 1117-1122.
284. Yao Q. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR region of *TPM1* gene with dilated cardiomyopathy: A case-control study // *Medicine (Baltimore)*. – 2019. – V. 98. – № 44. – P. e17710

285. Yar S. et al. Conserved Asp-137 is important for both structure and regulatory functions of cardiac α -tropomyosin (α -TM) in a novel transgenic mouse model expressing α -TM-D137L // The Journal of Biological Chemistry. – 2013. – V. 288. – № 23. – P. 16235-16246.

286. Ye J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC bioinformatics. – 2012. – V. 13. – Primer-BLAST. – P. 134.

287. Yu B. et al. Molecular pathology of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac myosin binding protein C gene // Journal of Medical Genetics. – 1998. – V. 35. – № 3. – P. 205-210.

288. Zemljic-Harpf A. E. et al. Cardiac-myocyte-specific excision of the vinculin gene disrupts cellular junctions, causing sudden death or dilated cardiomyopathy // Molecular and Cellular Biology. – 2007. – V. 27. – № 21. – P. 7522-7537.

289. Zhen C. et al. Signal transducer and transcriptional activation 1 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy // FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. – 2021. – V. 35. – № 1. – P. e21240.

290. Zheng Z. et al. Symphonizing pileup and full-alignment for deep learning-based long-read variant calling // Bioinformatics, 2021. – URL: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.12.29.474431> (date accessed: 24.07.2023). – Text: electronic.

291. Zhou N. et al. Whole-exome sequencing identifies rare compound heterozygous mutations in the *MYBPC3* gene associated with severe familial hypertrophic cardiomyopathy // European Journal of Medical Genetics. – 2018. – V. 61. – № 8. – P. 434-441.

292. Zou Y. et al. Multiple gene mutations, not the type of mutation, are the modifier of left ventricle hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy // Molecular Biology Reports. – 2013. – V. 40. – № 6. – P. 3969-3976.

Интернет-ресурсы:

293. База данных генетических вариантов [Электронный ресурс] : ClinVar. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> (дата обращения: 29.06.2023).

294. База данных генетических вариантов [Электронный ресурс] : GnomAD. URL: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (дата обращения: 04.06.2023).

295. База данных генетических вариантов [Электронный ресурс] : RUSeq. URL: <http://ruseq.ru/#/> (дата обращения: 29.06.2023).

296. База данных генетических вариантов [Электронный ресурс] : Simple ClinVar. URL: <https://simple-clinvar.broadinstitute.org/> (дата обращения: 21.07.2023).

297. База данных генетических взаимодействий микроРНК [Электронный ресурс] : miRTarBase. URL: <https://mirtarbase.cuhk.edu.cn> (дата обращения: 07.07.2023).

298. База данных генетической изменчивости микроРНК [Электронный ресурс] : miRNASNP-v3. URL: <https://mirtarbase.cuhk.edu.cn> (дата обращения: 03.07.2023).

299. База данных для аннотирования генетических вариантов [Электронный ресурс] : VannoPortal. URL: <http://www.mulinlab.org/vportal/index.html> (дата обращения: 27.07.2023).

300. База данных об экспрессии в тканях [Электронный ресурс] : Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. URL: <https://www.gtexportal.org/home/> (дата обращения: 28.07.2023).

301. База данных регуляторных взаимодействий в геноме [Электронный ресурс] : RegulomeDB. URL: <https://regulomedb.org/regulome-search> (дата обращения: 05.08.2023).

302. База данных структуры белков [Электронный ресурс] : AlphaFold Protein Structure Database. URL: <https://alphafold.ebi.ac.uk> (дата обращения: 12.07.2023).

303. База данных структуры и функции белков [Электронный ресурс] : UniProt. URL: <https://www.uniprot.org/> (дата обращения: 11.06.2023).

304. Геномный браузер UCSC [Электронный ресурс] : UCSC Genome Browser. URL: <http://www.mulinlab.org/vportal/> (дата обращения: 06.06.2023).

305. Инструмент для анализа аллель-специфичного связывания факторов транскрипции [Электронный ресурс] : ADAstra. URL: <https://adastra.autosome.org/bill-cipher> (дата обращения: 06.06.2023).

306. Инструмент для анализа данных высокопроизводительного нанопорового секвенирования [Электронный ресурс] : Medaka. URL: <https://github.com/nanoporetech/medaka> (дата обращения: 20.06.2023).

307. Инструмент для анализа данных высокопроизводительного секвенирования [Электронный ресурс] : Genome Analysis Toolkit. URL: <https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us> (дата обращения: 29.07.2023).

308. Инструмент для анализа характеристик олигонуклеотидов [Электронный ресурс] : IDT Olygo Analyzer Tool. URL: <https://www.idtdna.com/calc/analyzer> (дата обращения: 14.06.2023).

309. Инструмент для оценки качества высокопроизводительного секвенирования [Электронный ресурс] : FastQC. URL: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/index.html> (дата обращения: 10.06.2023).

310. "Инструмент для оценки патогенности генетических вариантов [Электронный ресурс] : Varsome. URL: <https://varsome.com/> (дата обращения: 01.06.2023)."

311. "Инструмент для оценки патогенности генетических вариантов [Электронный ресурс] : Калькулятор патогенности вариантов нуклеотидной последовательности МГНЦ. URL: <http://calc.generesearch.ru/> (дата обращения: 29.07.2023)."

312. Инструмент для предикции взаимодействия РНК-связывающих белков с генами [Электронный ресурс] : RBPmap. URL: <http://rbpmap.technion.ac.il/index.html> (дата обращения: 11.07.2023).

313. Инструмент для предикции вторичных структур нуклеиновых кислот [Электронный ресурс] : RNAfold. URL: <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi> (дата обращения: 02.08.2023).

314. Инструмент для предикции вторичных структур нуклеиновых кислот [Электронный ресурс] : RNAsnp. URL: <https://rth.dk/resources/rnasnp/> (дата обращения: 31.07.2023).

315. Инструмент для предикции связывания микроРНК с генами [Электронный ресурс] : TargetScan. URL: https://www.targetscan.org/vert_80/ (дата обращения: 14.07.2023).

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А1. Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации генов *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*

Ген	Координаты GRCh38.p13	Длина (п.о.) фрагмента	Последовательность (5'–3')	Условия ПЦР реакции
<i>MYBPC3</i>	chr11:47349064-47352970	3907	F: GTGAAATACAGGCTTTTGTGCAATG R: GTACAATTTGCTGTAAGAGGGACAC	BLM;66;20;0;3;35
	chr11:47343431-47349969	6539	F: GAGGCAAGGCTATGGGGGTC R: GCAGCAGGACACTCCCCAAG	BLM;60;20;0;5,5;35
	chr11:47343303-47346254	2951	F: GGAAGTGAGCCCGAGACAAA R: TGCTAAAGAGGCTCAAGGGC	BLM;68;20;0;3;35
	chr11:47337865-47344524	6659	F: TTCCCACTCCAATAACCGC R: CAGCAGCAACATGGGCTTTT	BLM;62;20;5%;5,5;35
	chr11:47334498-47342159	7661	F: CTGTGGCTTTTACTTTCCCTGTTCCAGA R: `CAGAAAAGAAGCTGGAGGTGTACCAGAG	BLMc;68;20;0;6;35;
	chr11:47330903-47336604	5701	F: TCTGAAGAGTGAATGCTGTAGGGGAAGA R: GGGACTGATTCCTGGTTTGTTTCAGTTCT	BLM;68;20;0;4;35
<i>MYH7</i>	chr14:23427651-23436257	8606	F: GCCACCTGGCTAGGAAATGT R: TTGGGGAACATGCACTCCTC	Q5;69;20;0;7;35
	chr14:23419524-23428272	8748	F: TGCATGATGACCTCCCACAC R: TTGACAGAACGCTGGGTCTC	BLM;62;20;20%;7;35
	chr14:23412217-23420342	8125	F: TGGTGGCTCTATTTAAAGGGGATGCAG R: AGAGCTAAACTGACTTGCTGTTCCAGAG	BLM;68;20;0;7;35
<i>TNNI3</i>	chr19:55156000-55158542	2542	F: ACATGGTCCTGAAGGAGTAGGTTG R: GATGGATTTCCCAGTGCTATTGAC	BLM;62;20;0;2;35
	chr19:55150151-55156191	6040	F: CCCTCTCAGCGTTTGTGTCT R: CCCAAGGATGCGAGGTTTCT	BLM;60;20;0;5,5;35

Продолжение Таблицы А1. Нуклеотидная последовательность праймеров для амплификации генов *МУН7*, *МУВРС3*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1*

Ген	Координаты GRCh38.p13	Длина (п.о.) фрагмента	Последовательность (5'–3')	Условия ПЦР реакции
<i>TNNT2</i>	chr1:201371060-201378100	7040	F: CAGGAGGGTCCCCATTTTCC R: GCCCTCTGCCTTCCAAGATT	BLM;60;20;0;5,5;35
	chr1:201365004-201371945	6941	F: CATCTGTCCCTGCTCCTCAC R: GGACCCGAGAAACCAGTCAG	BLM;60;20;0;5,5;35
	chr1:201361644-201367725	6081	F: CAATCCCCTGTCCTGACACC R: CACAGCAGCTTTGGAGGAGA	BLM;60;20;20%;5,5;35
	chr1:201358253-201363738	5485	F: ATTTGCTCTGGCTGGGAGAC R: CAGACTTCGTGGGAACCGAA	BLM;62;20;0;4;35
<i>TPM1</i>	chr15:63039120-63044192	5072	F: TCCAAGCATGTTCGTGGTGA R: CAGGCAAGAGGTGAGGGAAG	BLM;62;20;0;4;35
	chr15:63042872-63048223	5351	F: AAGGAGAACGCCTTGGATCG R: CTGGCTTCCACTTCTAGGGC	BLM;60;20;0;4;37
	chr15:63047136-63054505	7369	F: CCCACCTGACCAGATGAACC R: GCCGAGTCACCAGAAAGGAA	Q5;68;20;0;6;35
	chr15:63053395-63059801	6406	F: GGGAAGCCAGGAGAAGTGA R: ACCACCCATTTCTGCCAACA	BLM;60;20;0;5,5;35
	chr15:63059171-63065962	6791	F: GTTCATGTGCAAGCTGAGGC R: AGCTCAGAGAGGTGGGACAT	BLM;60;20;0;5,5;35
	chr15:63065347-63072293	6946	F: TCCAAGCCCACCTGTCATTC R: CTGGGGGACAACAGCAGATT	BLM;62;20;0;5,5;35

Примечание. F: прямой праймер, R: обратный праймер. Условия реакции: реакционная смесь (BLM – БиоМастер LR HS-ПЦР (2х) (БИОЛАБМИКС, РФ)/ BLMc – БиоМастер LR HS-ПЦР color (2х) (БИОЛАБМИКС, РФ)/ NEB - Q5® High-Fidelity 2X Master Mix (New England Biolabs, США)); температура отжига праймеров, °C; общий объем реакции, мкл; концентрация SE-стабилизатора ПЦР (СибЭнзайм, РФ), %; время элонгации, мин; количество циклов реакции.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б1. Нуклеотидная последовательность праймеров для подтверждения обнаруженных вариантов генов *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3* и *TPM1* с помощью секвенирования по Сэнгеру

Вариант	Последовательность (5'-3')	Условия ПЦР-реакции
Ген <i>MYBPC3</i>		
p. Gln1233Ter	F: CAGCCTTCTGGAAGCTATTGCC R: GCATAGTCAGGGACTCTCGTG	64, BLM LR
p.515_515del p. S424fs	F: GGTCACCTCAGCATCGTCAT R: TTTACAAACACGGCCGCAAG	64, BLM LR
p. Asp75Asn	F: CCTGGATGGATGGAGAGTCG R: AGTGGACACATGCAGAAAAAGT	58, BLM T
p. Val158Met	F: CATTTGCCCTTGAACCACTTG R: GACTCCATCTCAAACAAACAGAAA	60, BLM LR
p.Lys985Asn	F: AGCTCTCTGGGCCTTGTCTCAA R: TATAGCCTCTCTCCCCTGGGG	66, BLM T
p.Ala774Thr	F: TTCCCTCGGATCTGTTTGGC R: AGCCAGGACAGGGGTGAATA	62, BLM T
p.Arg326Gln	F: TTCTATCTCTGTGGTAAGGGGCTA R: GTGGCTACAGCTCCTTGGTCC	62, BLM T
Ген <i>MYH7</i>		
p.Arg243Cys	F: CCAACTTTCCTGTTGCCCCAA R: GCCCAATAAGCCCCTGTCTTC	Рис+, Та 62, BLM T
c.3337-2->C	F: TTGACAGAACGCTGGGTCTC R: GCATGTAGACTGTCAGGCCC	Та 68, BLM LR
p.Arg870His	F: ACCTCAGGTAGGAAGGAGGC R: TGTGGGAAGTGAAGGCAGAGC	Та 66, BLM LR
p.Tyr609Asn	F: CCT GTG TGA AGG ACA CTC AG R: CCTACCTCCCCACACTGATG	62, BLM T
p.Arg719Gln p.Leu714Arg	F: TGGGAGGGGTAGCATAACAGG R: AGCCAGGATCAGAACCCAGA	66, BLM LR
Ген <i>TNNT2</i>		
p.Ala38Val	F: ACAGATAAGCCCTAGCCAAGATG R: ACAGTCAAAACCAAGAATGGCAG	64, BLM T
p.Arg278Cys	F: AGGGGACGTGACAGAAATGC R: CTCGTGCTTCTCTCCCTGTG	60, BLM T
Ген <i>TNNI3</i>		
p.Arg68=	F: ACATGGTCCTGAAGGAGTAGGTTG R: AGGAATCAGCTCTGGGCAAC	68, BLM LR
Ген <i>TPM1</i>		
p.Glu102Gly	F: GTTCATGTGCAAGCTGAGGC R: ACCACCCATTTCTGCCAACA	66, BLM LR

Та – температура отжига праймеров, °C; использование готовых реакционных смесей: BLM T – БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×), BLM LR – БиоМастер LR HS-ПЦР (2×).

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Таблица В1. Характеристика вариантов, ранжированных по параметру Phred CADD>10, в генах саркомерных белков у 36 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с ГЛЖ при АГ

Параметр Phred	SNP ID	Генетический вариант (GRCh38), локализация	Частота аллеля в группе пациентов с ГКМП (n=36)/ с ГЛЖ при АГ (n=13)/популяции (европейцы), GnomAD v2.1.1(RUSeq)	Ассоциация с CC3 (GWAS catalog) [PMID]	Оценка по RegulomeDB v. 2.2, ранг/шкала	Ген -ткани сердечно-сосудистой системы, мышц (GTEx V8)		Факторы транскрипции с аллель-специфичным связыванием (ADAstra)
						eQTL	sQTL	
Ген MYBPC3								
43,00	rs397516037	11-47332189-G-A, экзон 33/35 (p.Gln1233Ter)	0,04/-/-	-	4; 0.61	-	-	-
23,10	rs34580776	11-47346320-C-T, экзон 12/35 (p.Arg326Gln)	нд/нд/0,01	-	4; 0.61	-	-	-
12,92	rs3729989	11-47348490-T-C, экзон 6/35 (p.Ser236Gly)	нд/нд/0,13(0,08)	Параметры ЭКГ [PMID 32916098], масса левого желудочка [PMID: 36944631]	1f; 0.55	PSMC3 и PACSIN3 – УПП, А, ТА; MADD – К	PACSIN3 – УПП, ЛЖ	-
Ген MYH7								
20,20	rs112635270	14-23435859-T-A, промотор	0,04/-/0,03	-	2b; 0.34	-	-	-
13,55	-	14-23423053-T-G, интрон 1/39	-/0,08/-	-	7; 0.18	-	-	-
12,04	rs7159367	14-23418436-T-C, интрон 29/39	0,29/0,35/0,36(0,33)	-	1d; 0.43	MYH7 – А	-	-
11,04	rs41285540	14-23414195-C-G, интрон 37/39	0,03/0,08/0,08	-	1b; 0.99	-	NGDN – УПП, CM	

Продолжение Таблицы В1. Характеристика вариантов, ранжированных по параметру Phred CADD>10, в генах саркомерных белков у 36 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с ГЛЖ при АГ

Параметр Phred	SNP ID	Генетический вариант (GRCh38), локализация	Частота аллеля в группе пациентов с ГКМП (n=36)/ с ГЛЖ при АГ (n=13)/популяции (европейцы), GnomAD v2.1.1(RUSeq)	Ассоциация с CC3 (GWAS catalog) [PMID]	Оценка по RegulomeDB v. 2.2, ранг/шкала	Ген -ткани сердечно-сосудистой системы, мышц (GTEx V8)		Факторы транскрипции с аллель-специфичным связыванием (ADAstra)
						eQTL	sQTL	
Ген <i>TNNI3</i>								
12,37	rs3729711	19-55156279-C-A, экзон 5/8 (p.Arg68=)	0,04/-/0,06(0,04)	-	1f; 0.55	-	-	ZFX
10,45	rs11671293	19-55157437-T-C, интрон 1/7	0,03/0,08/0,20	-	1f; 0.55	<i>CTD-2587H24.5</i> –ЛЖ; <i>TNNI3</i> – CM; <i>TNNT1</i> – K; <i>DNAAF3</i> – TA	-	SPI1
Ген <i>TNNT2</i>								
23,50	rs3730238	1-201361301-T-C, экзон 15/17 (p.Lys263Arg)	0,06/-/0,02(0,02)	-	5; 0.13	-	-	-
19,51	rs1104859	1-201362426-T-G, интрон 12/16	0,68/0,81/0,72(0,75)	Параметры ЭКГ [PMID 32916098]	1f; 0.22	<i>PKP1</i> – CM	<i>TNNT2</i> – УПП	-
16,48	rs138604711	1-201362423-C-T, интрон 12/16	-/0,04/0,0004(0,0003)	-	5; 0.13	-	-	-
15,18	rs45529540	1-201377920-G-A, промотор	0,04/0,04/0,05	-	2b; 0.74	-	-	

Продолжение Таблицы В1. Характеристика вариантов, ранжированных по параметру Phred CADD>10, в генах саркомерных белков у 36 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с ГЛЖ при АГ

Параметр Phred	SNP ID	Генетический вариант (GRCh38), локализация	Частота аллеля в группе пациентов с ГКМП (n=36)/ с ГЛЖ при АГ (n=13)/популяции (европейцы), GnomAD v2.1.1(RUSeq)	Ассоциация с CC3 (GWAS catalog) [PMID]	Оценка по RegulomeDB v. 2.2, ранг/шкала	Ген -ткани сердечно-сосудистой системы, мышц (GTEx V8)		Факторы транскрипции с аллель-специфичным связыванием (ADAstra)
						eQTL	sQTL	
14,32	rs12568177	1-201375914-C-T, интрон 1/16	-/0,04/0,02	-	5; 0.13	-	-	-
12,51	-	1-201377801-G-A, промотор	0,01/-/-	-	2b; 0.76	-	-	-
12,43	rs10920181	1-201361001-T-C, интрон 15/16	0,10/-/0,10	-	5; 0.24	-	TNNT2 – УПП	-
11,79	rs4915240	1-201371368-G-A, интрон 4/16	0,64/0,77/0,62	-	1f; 0.55	PKP1 – CM	TNNT2 – УПП	-
10,80	rs3729547	1-201365254-G-A, экзон 10/17 (p.Ile116Ile)	0,69/0,81/0,72(0,75)	-	1f; 0.55	PKP1 – CM	TNNT2 – УПП	-
10,25	rs947485	1-201376224-A-G, интрон 1/16	0,56/0,73/0,63	-	1f; 0.55	PKP1 – CM	TNNT2 – УПП	-
Гены TPM1, TPM-AS								
18,96	rs62013181	15-63043900-C-G, интрон 1/9	0,06/-/0,08(0,06)	-	1f; 0.55	LACTB – УПП; APH1B –A, TA	-	ANDR
18,82	rs35829897	15-63042489-G-C, промотор	0,01/0,04/0,21	-	1f; 0.55	LACTB – CM; TPM1 – TA	-	ESR1
17,77	rs7178040	15-63071899-G-T, 3'UTR	0,20/0,19/0,13	-	1f; 0.55	-	TPM1 – ЛЖ, УПП	-
16,90	rs28730802	15-63061810-G-C, интрон 6/9	0,03/-/0,01(0,01)	-	4; 0.61	-	-	-

Продолжение Таблицы В1. Характеристика вариантов, ранжированных по параметру Phred CADD>10, в генах саркомерных белков у 36 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с ГЛЖ при АГ

Параметр Phred	SNP ID	Генетический вариант (GRCh38), локализация	Частота аллеля в группе пациентов с ГКМП (n=36)/ с ГЛЖ при АГ (n=13)/популяции (европейцы), GnomAD v2.1.1(RUSeq)	Ассоциация с CC3 (GWAS catalog) [PMID]	Оценка по RegulomeDB v. 2.2, ранг/шкала	Ген -ткани сердечно-сосудистой системы, мышц (GTEx V8)		Факторы транскрипции с аллель-специфичным связыванием (ADAstra)
						eQTL	sQTL	
15,48	rs57645645	15-63047379-G-A, интрон 2/9, нкРНК	0,17/0,15/0,14	-	1f; 0.55	<i>LACTB</i> – TA; <i>TPM1</i> – K	-	-
15,04	-	15-63047328-A-G, интрон 2/9, нкРНК	0,01/-/-	-	4; 0.61	-	-	-
14,92	rs28609950	15-63049550-G-T, интрон 2/9	0,01/0,04/0,002	-	2b; 0.62	-	-	-
14,86	rs570374605	15-63051424-C-A, интрон 2	0,01/-/0,002	-	4; 0.61	-	-	-
14,55	rs189122050	15-63045131-G-T, интрон 2/9	0,01/-/0,01	-	2a; 0.83	-	-	-
14,44	rs111470259	15-63048506-C-T, интрон 2/9, нкРНК	0,24/0,19/0,11(0,14)	-	1f; 0.55	<i>RPS27L</i> – K; <i>LACTB</i> – TA	-	ANDR, JUN, RAD21, SSXT
14,41	rs707602	15-63071538-T-C, 3'UTR	0,20/0,19/0,13	-	1f; 0.55	-	<i>TPM1</i> – ЛЖ, УПП	-
13,95	rs66793829	15-63049039-G-C, интрон 2/9, нкРНК	0,14/0,12/0,18	-	1f; 0.55	<i>RPS27L</i> – K; <i>LACTB</i> – TA	-	-
13,59	rs8042050	15-63063672-C-G, интрон 8/9	0,09/0,12/0,13	-	1f; 0.67	-	<i>TPM1</i> – ЛЖ, УПП	-
13,59	rs1071646	15-63059641-C-A, экзон 4/10 (p.Ala151=)	0,64/0,65/0,66(0,65)	-	1f; 0.55	<i>LACTB</i> – УПП, CM; <i>TPM1</i> – A, KA, TA	<i>TPM1</i> – ЛЖ, УПП	-

Продолжение Таблицы В1. Характеристика вариантов, ранжированных по параметру Phred CADD>10, в генах саркомерных белков у 36 пациентов с ГКМП и 13 пациентов с ГЛЖ при АГ

Параметр Phred	SNP ID	Генетический вариант (GRCh38), локализация	Частота аллеля в группе пациентов с ГКМП (n=36)/ с ГЛЖ при АГ (n=13)/популяции (европейцы), GnomAD v2.1.1(RUSeq)	Ассоциация с CC3 (GWAS catalog) [PMID]	Оценка по RegulomeDB v. 2.2, ранг/шкала	Ген -ткани сердечно-сосудистой системы, мышц (GTEx V8)		Факторы транскрипции с аллель-специфичным связыванием (ADAstra)
						eQTL	sQTL	
13,03	rs4075047	15-63048408-T-C, интрон 2/9, нкРНК	0,31/0,19/0,14(0,16)	-	1a; 0.34	<i>TPM1</i> – К; <i>LACTB</i> – TA	-	BC11B, JUN, STAT1, CTCF, ANDR, STAG1
12,71	rs73431508	15-63048217-A-G, интрон 2/9, нкРНК	0,20/0,19/0,14	-	1f; 0.55	<i>TPM1</i> – К; <i>LACTB</i> – TA	-	JUN, BRCA2, ANDR
12,44	rs11636549	15-63065089-T-G, интрон 9/9	0,11/0,12/0,14	-	1f; 0.55	-	<i>TPM1</i> – ЛЖ, УПП	-
11,61	rs11856618	15-63048874-C-A, нкРНК	0,01/-/0,04(0,04)	-	2a; 0.98	-	-	-
11,46	rs8026502	15-63046558-T-C, интрон 2/9, нкРНК экзон	0,24/0,15/0,14	-	1f; 0.55	<i>TPM1</i> – К; <i>LACTB</i> – TA	-	-
10,73	rs11558747	15-63059674-T-C, экзон 4/10 (p.Tyr162=)	0,06/0,08/0,07(0,07)	-	1f; 0.55	-	-	-
10,73	rs72743223	15-63056172-T-C, интрон 2/9	0,17/0,12/0,10	-	1f; 0.55	<i>RPS27L</i> – К	-	-
10,41	rs3803499	15-63051119-T-C, интрон 2/9	0,26/0,15/0,21	-	1f; 0.67	<i>LACTB</i> , <i>RP11-244F12.3</i> – CM; <i>TPM1</i> – TA	-	-

Примечание: УПП – ушко правого предсердия; А – аорта; ТА – тиббиальная артерия; КА – коронарная артерия; К – кровь; ЛЖ – левый желудочек; CM – скелетные мышцы; нд – нет данных.

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Таблица Г1. Гаплотипы в гене *TPM1*, образованные потенциально значимыми функциональными вариантами, у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Вариант	63042489; rs35829897	63043900; rs62013181	63045131; rs189122050	63046558; rs8026502	63047328; _	63047379; rs57645645	63048217; rs73431508	63048408; rs4075047	63048506; rs111470259	63048874; rs11856618	63049039; rs66793829	63049550; rs28609950	63051119; rs3803499	63051424; rs570374605	63056172; rs72743223	63059641; rs1071646	63059674; rs11558747	63061810; rs28730802	63063672; rs8042050	63065089; rs11636549	63071455; rs8519	63071538; rs707602	63071702; rs6738	63071899; rs7178040	Выборка	
R	G	C	G	T	A	G	A	T	C	C	G	G	T	C	T	C	T	G	C	T	A	T	C	G	1	2
A	C	G	T	C	G	A	G	C	T	A	C	T	C	A	C	A	C	C	G	G	G	C	T	T		
Гаплотип																										
№1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	9	8
№2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	3	1
№3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№6	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0
№8	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	1
№10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	5	2
№11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3
№12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
№13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
№14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
№15	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	3	0
№16	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№17	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0

Продолжение Таблицы Г1. Гаплотипы в гене *TPM1*, образованные потенциально значимыми функциональными вариантами, у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Вариант	63042489; rs35829897	63043900; rs62013181	63045131; rs189122050	63046558; rs8026502	63047328; rs111470259	63047379; rs57645645	63048217; rs73431508	63048408; rs4075047	63048506; rs111470259	63048874; rs11856618	63049039; rs66793829	63049550; rs28609950	63051119; rs3803499	63051424; rs570374605	63056172; rs72743223	63059641; rs1071646	63059674; rs11558747	63061810; rs28730802	63063672; rs8042050	63065089; rs11636549	63071455; rs8519	63071538; rs707602	63071702; rs6738	63071899; rs7178040	Выборка	
R	G	C	G	T	A	G	A	T	C	C	G	G	T	C	T	C	T	G	C	T	A	T	C	G	1	2
A	C	G	T	C	G	A	G	C	T	A	C	T	C	A	C	A	C	C	G	G	G	C	T	T		
Гаплотип																										
№18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
№20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0
№21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
№22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	2	0
№23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0
№26	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
№27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№28	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№30	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№32	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№33	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№34	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№35	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0

Продолжение Таблицы Г1. Гаплотипы в гене *TPM1*, образованные потенциально значимыми функциональными вариантами, у пациентов с ГКМП и с гипертрофией миокарда при артериальной гипертензии

Вариант	63042489; rs35829897	63043900; rs62013181	63045131; rs189122050	63046558; rs8026502	63047328; rs111470259	63047379; rs57645645	63048217; rs73431508	63048408; rs4075047	63048506; rs111470259	63048874; rs11856618	63049039; rs66793829	63049550; rs28609950	63051119; rs3803499	63051424; rs570374605	63056172; rs72743223	63059641; rs1071646	63059674; rs11558747	63061810; rs28730802	63063672; rs8042050	63065089; rs11636549	63071455; rs8519	63071538; rs707602	63071702; rs6738	63071899; rs7178040	Выборка	
R	G	C	G	T	A	G	A	T	C	C	G	G	T	C	T	C	T	G	C	T	A	T	C	G	1	2
A	C	G	T	C	G	A	G	C	T	A	C	T	C	A	C	A	C	C	G	G	G	C	T	T		
Гаплотип																										
№36	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№37	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
№38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
№39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
№40	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
№41	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
№42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
№43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
№44	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1
№45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
№46	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
№47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
№48	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№49	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
№50	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0

Примечание: Зеленым цветом выделены ячейки, содержащие информацию об альтернативном аллеле варианта, желтым цветом – варианты с частотой аллеля в популяции >50% (GnomAD - европейцы, RUSeq). Выборка 1 – пациенты с гипертрофической кардиомиопатией, выборка 2 – пациенты с гипертрофией левого желудочка при артериальной гипертензии, вариант – указаны координаты хромосомы 15 по GRCh38/hg38 сборке генома человека; SNP ID, R - аллель референсный, A - альтернативный аллель.

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Таблица Д1. Ассоциации отдельных SNP с вариабельностью количественных признаков у пациентов с ГКМП

Ген	Позиция варианта в геноме; rs#	Признак*	Генотип, группа 1 (n)	Генотип, группа 2 (n)	Медианное значение в группе 1 (Q1;Q4)	Медианное значение в группе 2 (Q1;Q4)	Уровень значимости по критерию Манна- Уитни	Примечание
<i>TNNT2</i>	1:201372048; rs45533739	ММЛЖ ИММЛЖ ММЛЖ ИММЛЖ	-/- (12) -/- (12) -/- (12) -/- (12)	AGAAG/- (11) AGAAG/- (11) AGAAG/- + AGAAG/AGAAG (12)	386,5 (334,6; 454) 205,8 (182; 240,3) 386,5 (334,6; 454) 205,8 (182; 240,3)	289,4 (252; 343,3) 134 (129; 191,1) 306 (254,5; 348,6) 143,7 (130,5; 192,1)	0,0225 0,0225 0,0242 0,0242	ИММЛЖ< 300
<i>TPM1</i>	15:63071455; rs8519	МЖП ММЛЖ ИММЛЖ	AA (17) AA (15) AA (15)	GG (14) GG (10) GG (10)	19 (16; 22) 322,5 (252; 392,6) 153,3 (129; 191,1)	22,2 (19; 29) 386,5 (354; 463) 208,9 (197,5; 280)	0,0290 0,0192 0,0080	-
	15:63059641; rs1071646	МЖП ММЛЖ ИММЛЖ ИММЛЖ	CC (13) CC (12) CC (11) CC+CA (23)	AA (35) AA (26) AA (25) AA (25)	17 (16; 20) 292,5 (245,6; 326,5) 145,4 (112,7; 180,3) 145,2 (125,1; 190,1)	21 (18;26) 349,1 (284,2; 398,8) 193 (166,9; 216,9) 193 (166,9; 216,9)	0,0316 0,0194 0,0161 0,0360	
	15:63049039; rs66793829	ИММЛЖ	GG (26)	GC (11)	195,2 (134; 224)	153,3 (132,5; 180,3)	0,0432	
	15:63051119; rs3803499	ФВ	ТТ (23)	ТC+CC (13)	80 (71; 83)	71 (59; 74)	0,0133	
	11:47338861; rs2269434	ЗСЛЖ	ТТ (15)	ТC+CC (28)	16 (14;17)	13 (12; 15,1)	0,0159	
<i>MYH7</i>	14:23431585; rs2069542	Градиент	GG (21)	GA (12)	38,2 (21,4; 72,3)	54,2 (47; 80,1)	0,0126	Mut=0

Продолжение Таблицы Д1. Ассоциации отдельных SNP с вариабельностью количественных признаков у пациентов с ГКМП

Ген	Позиция варианта в геноме; rs#	Признак*	Генотип, группа 1 (n)	Генотип, группа 2 (n)	Медианное значение в группе 1 (Q1;Q4)	Медианное значение в группе 2 (Q1;Q4)	Уровень значимости по критерию Манна- Уитни	Примечани е
	14:23418436; rs7159367	ФВ ФВ МЖП ИММЛЖ МЖП/ЗСЛЖ ФВ ММЛЖ	ТТ (15) ТТ (12) ТТ (18) ТТ (11) ТТ (13) ТТ (12) ТТ (11)	ТС (9) ТС (6) ТС (10) ТС (7) ТС+СС (9) ТС+СС (7) ТС+СС (10)	64 (61; 73) 67,5 (58; 76,5) 24,5 (19; 27) 204,2 (144; 239) 1,5 (1,3; 1,8) 67,5 (58; 76,5) 371,9 (303,6; 463)	80 (71; 81) 80,5 (72; 81) 18,5 (16; 23) 132 (111; 198,2) 1,2 (1,1; 1,3) 80 (72; 81) 275,8 (251; 354)	0,0409 0,0245 0,0311 0,0441 0,0434 0,0221 0,0357	Mut=0 Mut=0 Mut=0 Mut=0 Mut=0 Mut=0
	14:23423679; rs7157716	МЖП/ЗСЛЖ	АА (21)	АГ (15)	1,2 (1,1; 1,5)	1,6 (1,3; 1,8)	0,0457	Age>30
<i>TNNI3</i>	19:55157437; rs11671293	ФВ Возраст Возраст	ТТ (13) ТТ (6) ТТ (24)	ТС+СС (6) ТС+СС (6) ТС+СС (19)	80 (72; 81) 62,5 (59; 64) 62,5 (55,5; 66)	62,5 (61; 71) 38 (36; 53) 53 (41; 62)	0,0220 0,0260 0,0171	Mut=0 Mut=1 Age>30

*Примечание – единицы измерения признака: возраст – в годах; ФВ - %; градиент давления – мм ртутного столба, МЖП, ЗСЛЖ - мм; ММЛЖ – г; ИММЛЖ – г/м²; “n” – численность подгрупп; «Mut=1» - подгруппа пациентов с выявленными вариантами III–V классов патогенности; «Mut=0» - подгруппа пациентов без таких вариантов. Age>30 – подгруппа пациентов старше 20 и 30 лет, соответственно. ИММЛЖ <300 - подгруппа пациентов без экстремально высоких значений ИММЛЖ.

БЛАГОДАРНОСТИ

В первую очередь хотел бы выразить свою благодарность научному руководителю, доктору медицинских наук, руководителю лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ Марии Сергеевне Назаренко за неоценимую помощь в реализации данной работы, проявленное терпение и понимание.

Благодарю своего научного куратора – старшего научного сотрудника лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, кандидата биологических наук, Марию Владимировну Голубенко за идеи, советы и поддержку.

Благодарю научного сотрудника лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, кандидата медицинских наук Рамиля Ринатовича Салахова, за помощь при выполнении отдельных разделов работы. Благодарю научного сотрудника лаборатории популяционной генетики НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, кандидата медицинских наук Зарубина Алексея Андреевича за помощь в биоинформатической обработке данных.

Отдельную благодарность выражаю доктору медицинских наук, профессору, Елене Николаевне Павлюковой; доктору медицинских наук, Елене Валерьевне Заклязьминской; сотрудникам Центра им. ак. Е.Н. Мешалкина и лаборатории эпигенетики развития Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск); сотрудникам Городской больницы №40 (г. Санкт-Петербург) за работу с пациентами и предоставление материалов для работы.

Благодарю научного руководителя Томского НИМЦ, академика РАН, доктора медицинских наук, профессора, Валерия Павловича Пузырева; директора Томского НИМЦ, академика РАН, доктора биологических наук, профессора, Вадима Анатольевича Степанова и врио директора НИИ медицинской генетики, доктора биологических наук, профессора РАН, Игоря

Николаевича Лебедева, за предоставленную возможность выполнить эту работу в НИИ медицинской генетики.

Выражаю благодарность кандидату медицинских наук, Николаю Алексеевичу Скрябину; доктору биологических наук, Аксане Николаевне Кучер; кандидату медицинских наук, Ольге Александровне Салюковой и кандидату биологических наук, Ирине Юрьевне Хитринской, за их участие и поддержку на разных этапах подготовки данной работы.

Также хотел бы выразить глубокую признательность всем коллегам, своим родным и близким за помощь и поддержку.