

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ ИМЕНИ
АКАДЕМИКА Б.В. ПЕТРОВСКОГО»**

На правах рукописи

Шестак Анна Геннадьевна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ АРИТМОГЕННОЙ
КАРДИОМИОПАТИИ ПРАВОГО ЖЕЛУДОЧКА
У РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ**

Специальность 1.5.7. Генетика

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Заклязьминская Е.В.

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования.....	6
Цель и задачи исследования	7
Научная новизна	8
Практическая значимость работы	8
Основные положения, выносимые на защиту.....	9
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	9
Апробация результатов.....	9
Внедрение результатов исследования в практику.....	10
Публикации.....	11
Личный вклад автора в проведение исследования	11
Структура и объём диссертации	11
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Значение и биологические функции десмосом.....	12
1.2. Определение и история изучения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка.....	15
1.3. Характеристика генов аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка и их белковых продуктов.....	19
1.3.1 Десмосомные гены <i>PKP2</i> , <i>DSG2</i> , <i>DSP</i> , <i>DSC2</i> , <i>JUP</i> : структура, спектр мутаций. Строение и функции белков.....	22
1.3.2 Не-десмосомные гены <i>TMEM43</i> , <i>TGFB3</i> , <i>PLN</i> , <i>CTNNA3</i> : структура, спектр мутаций. Строение и функции белков.....	25
1.3.3 Не-десмосомные гены <i>LMNA</i> и <i>DES</i> : структура, спектр мутаций. Строение и функции ламина и десмина.....	27
1.3.4 Ген <i>TTN</i> : структура, спектр мутаций. Строение и функции титина.....	28
1.3.5 Ген <i>SCN5A</i> : структура, спектр мутаций. Строение и функции альфа- субъединицы натриевого канала.....	28
1.3.6 Новые гены-кандидаты АКПЖ: структура, спектр мутаций. Строение и функции белков.....	30
1.4. Современные подходы к ДНК-диагностике АКПЖ. Причины ограничения эффективности ДНК-диагностики.....	31

1.4.1. Выявление вариаций числа копий в генах АКПЖ.....	33
1.4.2. Явление «выпадения» аллеля - частый феномен, снижающий точность ДНК-диагностики.....	34
1.5. Клинико-инструментальная диагностика АКПЖ.....	38
1.5.1. Диагностические критерии АКПЖ.....	40
1.5.2. Полиморфизм клинических проявлений АКПЖ. Комплексные фенотипы кардиомиопатий.....	43
1.6. Перспективы лечения сердечно-сосудистых заболеваний на генном уровне.....	45
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Структура выборки больных.....	49
2.2. Молекулярно-генетическое исследование.....	50
2.2.1. Выделение ДНК из крови.....	50
2.2.2. Дизайн оригинальных олигопраймеров и проведение амплификации исследуемых фрагментов ДНК.....	51
2.2.3. Прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру.....	51
2.2.4. Высокопроизводительное полупроводниковое секвенирование на платформе Ion Torrent.....	52
2.2.5. Полноэкзомное секвенирование.....	53
2.3. Биоинформатический анализ результатов секвенирования.....	54
2.3.1. Обработка и визуализация результатов секвенирования.....	54
2.3.2. Название и интерпретация генетических вариантов.....	55
2.3.3. Выявление случаев «выпадения» аллеля.....	59
2.4. Анализ выявленных генетических вариантов в группах пациентов и здоровых доноров.....	59
2.4.1. Сегрегационный анализ.....	59
2.4.2. Анализ частот выявленных генетических вариантов в контрольной группе здоровых доноров.....	60
2.4.3. Анализ выявленных генетических вариантов в группе пациентов с ДКМП.....	60
2.4.4. Анализ частоты минорного аллеля генетического варианта p.S194L в гене DSG2 в контрольной группе здоровых доноров и больных из Биобанка РНЦХ.....	60
2.5. Статистический анализ полученных данных.....	61

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
3.1. Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка.....	62
3.1.1. <i>Спектр выявленных каузативных генетических вариантов в генах RCP2, DSG2, DSP, кодирующих десмосомные белки.....</i>	<i>62</i>
3.1.2. <i>Спектр выявленных каузативных генетических вариантов в генах LMNA, SCN5A, MYBPC3, MYH7, кодирующих не-десмосомные белки.....</i>	<i>65</i>
3.1.3. <i>Спектр выявленных генетических вариантов неустановленного значения в десмосомных и не-десмосомных генах.....</i>	<i>68</i>
3.1.4. <i>Доля выявленных вариантов III-V класса патогенности в исследованных генах.....</i>	<i>71</i>
3.2. Эффективность проведенной ДНК-диагностики пациентов с АКПЖ.....	73
3.2.1. <i>Диагностический выход проведенной ДНК-диагностики.....</i>	<i>74</i>
3.2.2. <i>Вклад генетических данных в диагностику заболевания.....</i>	<i>77</i>
3.2.3. <i>Сравнение спектров генетических вариантов в группах больных с АКПЖ и ДКМП.....</i>	<i>78</i>
3.2.4. <i>Выявление случаев «выпадения» аллеля в генах АКПЖ.....</i>	<i>81</i>
3.3. Гено-фенотипические корреляции в группе больных с АКПЖ.....	89
3.3.1. <i>Спектр клинических проявлений аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка.....</i>	<i>89</i>
3.3.2. <i>Результаты сегрегационного анализа для пациентов с АКПЖ.....</i>	<i>93</i>
3.3.3. <i>«Частые» мутации у больных с АКПЖ.....</i>	<i>94</i>
3.3.4. <i>Возможные варианты-модификаторы в генах АКПЖ.....</i>	<i>97</i>
3.3.5. <i>Генетические варианты у пациентов с сочетанием АКПЖ с СНМЛЖ и повышенной трабекулярностью ЛЖ.....</i>	<i>99</i>
3.3.6. <i>Ре-интерпретация генетических вариантов у пациентов с АКПЖ.....</i>	<i>100</i>
3.3.7. <i>Анализ корреляций «фенотип-генотип» для различных групп пациентов.....</i>	<i>102</i>
3.3.8. <i>Алгоритм молекулярно-генетической диагностики больных с АКПЖ.....</i>	<i>105</i>
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	107
ВЫВОДЫ.....	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	112
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	113
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	114
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	116

ПРИЛОЖЕНИЯ	140
<i>Приложение 1. Популяционные генетические варианты, выявленные на панели I «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки», не имеющие явного клинического значения</i>	140
<i>Приложение 2. Популяционные генетические варианты, выявленные на панели II «Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки», не имеющие явного клинического значения</i>	146

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Процесс клеточной адгезии принимает участие во всех аспектах развития тканей у многоклеточных организмов: от морфогенеза (регуляция формы клеток, движения клеток, формирования сложных структур и апоптоза) до процессов старения и развития заболеваний. Основным компонентом в регуляции межклеточных контактов является десмосома.

Десмосомы представляют собой белковые структуры, основной функцией которых является сильная межклеточная адгезия, называемая так же гиперадгезией. Десмосомы наиболее развиты в тканях, подверженным частым механическим воздействиям. Кроме того, десмосомы выполняют сигнальные функции, необходимые для процессов развития, морфогенеза тканей и ремоделирования тканей.

Важность десмосом в поддержании целостности тканей в организме человека подчеркивается немалым числом заболеваний, ассоциированных с нарушениями их функции. Среди них наследственные заболевания эпидермиса и миокарда, а также аутоиммунное заболевание пемфигус (пузырчатка).

Десмосомы хорошо выражены в миокарде: вместе с адгезивными контактами они образуют так называемые вставочные диски (нексусы) между кардиомиоцитами. За счет наличия плотных вставочных дисков в ответ на электрическую стимуляцию соседних клеток развивается потенциал действия (ПД) кардиомиоцита.

При замещении кардиомиоцитов клетками фиброзной или жировой ткани связи между клетками разрушаются, а миокард становится субстратом для возникновения аритмий. Наследственное заболевание, характеризующееся прогрессирующим замещением клеток миокарда правого желудочка фиброзной и/или жировой тканью, носит название аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (АКПЖ).

АКПЖ называют «болезнью десмосом», т.к. в большинстве случаев заболевание ассоциировано с патогенными вариантами в генах, кодирующих десмосомные белки. В разных этнических группах аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка является причиной 10,4%-25% случаев внезапной сердечной смерти молодых людей в возрасте 17-40 лет [1–4].

В большинстве случаев заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, что заставляет ожидать высокой частоты случаев болезни среди кровных родственников пробанда.

У значительной части больных диагноз устанавливается только после перенесенного эпизода остановки сердца или посмертно.

Полноценных исследований и достоверной информации о распространенности АКПЖ в российской популяции нет. Между тем, серьезный прогноз и повышенный риск внезапной сердечной смерти делает изучение этого заболевания социально значимым.

В настоящее время проведение диагностики наследственных кардиомиопатий и определение тактики лечения для таких больных базируются на информации о молекулярно-генетической природе заболевания. Исследований генетического разнообразия причин аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка, подходов к ДНК-диагностике, спектра генетических вариантов в генах десмосом и в связанных с ними не-десмосомных генах, изучения гено-фенотипических корреляций в группе российских больных до настоящей работы не проводилось, что определяет актуальность темы исследования.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы явилось изучение полиморфизма генов, кодирующих основные десмосомные и не-десмосомные белки, и клинико-генетического полиморфизма аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка у российских пациентов.

Задачи исследования

1. Проанализировать спектр редких генетических вариантов в генах, кодирующих десмосомные и не-десмосомные белки, у российских пациентов с АКПЖ.
2. Оценить диагностическую эффективность таргетной панели, включающей 16 генов, у пациентов с различными вариантами манифестации АКПЖ, и предложить оптимизированный протокол ДНК-диагностики заболевания.
3. Изучить факторы, снижающие эффективность различных методов секвенирования, и предложить подходы к их контролю.
4. Провести анализ спектра фенотипических проявлений АКПЖ у генотип-позитивных и генотип-негативных пациентов, и оценить наличие гено-фенотипических корреляций.

Научная новизна

1. Впервые в России разработаны и внедрены в практическую работу протоколы ДНК-диагностики АКПЖ, что позволило проводить исследование этого заболевания в соответствии с международными рекомендациями.

2. Впервые изучен спектр генетических вариантов в генах, кодирующих белки десмосом и ассоциированных с ними белков. Идентифицированы мутации, в том числе новые, приводящие к развитию заболевания.

3. Впервые изучена диагностическая эффективность проведенной ДНК-диагностики при различных вариантах ремоделирования миокарда.

4. Впервые исследован феномен «выпадения» аллеля на обеих платформах для секвенирования ДНК. Было продемонстрировано влияние «выпадения» аллеля на диагностический выход ДНК-диагностики АКПЖ. Впервые проведена оценка риска «выпадения» аллеля в таргетных панелях генов.

Практическая значимость работы

1. Создан регистр больных с АКПЖ, который включает в себя клинические данные, данные семейного анамнеза и биологический материал; создан биобанк биологических образцов (венозная кровь, ДНК) пациентов с АКПЖ.

2. Предложен алгоритм ДНК-диагностики АКПЖ. Полученные данные позволяют продемонстрировать целесообразность проведения диагностики для пациентов с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка: проводить профилактику внезапной сердечной смерти у носителей мутаций, проводить каскадный скрининг семей пробандов с выявленными мутациями, в случае малосимптомных больных – своевременно выявлять носителей мутаций.

3. Полученные результаты и алгоритмы могут быть использованы при медико-генетическом консультировании, в лабораториях ДНК-диагностики, в практической работе специализированных кардиологических и кардиохирургических центров и отделений, при оценке риска ВСС, для выбора тактики лечения, формирования системы мероприятий, направленных на первичную и вторичную профилактику ВСС у пациентов с АКПЖ, а также в лекционном и практическом образовательном процессе.

4. Исследован феномен «выпадения» аллеля на обеих платформах для секвенирования ДНК пациентов с АКПЖ. Полученные результаты могут быть применимы для исследования данного феномена при других нозологиях, а также для разработки биоинформатических ресурсов для поиска потенциальных регионов «выпадения» аллеля.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Генетические варианты IV-V классов патогенности, связанные с развитием аритмогенной кардиомиопатии, могут быть обнаружены как в десмосомных, так и в недесмосомных генах. Большая часть таких вариантов была выявлена в десмосомных генах *PKP2* и *DSP* и представлена типом вариантов, приводящих к прекращению синтеза белка.
2. Диагностическая эффективность проведенной ДНК-диагностики была различной при разных вариантах ремоделирования миокарда.
3. Генетические варианты III-V классов патогенности в десмосомных генах преобладают у пробандов с АКПЖ по сравнению с пробандами с ДКМП.
4. Явление «выпадения» аллеля – феномен, значимо влияющий на точность ДНК-диагностики АКПЖ методами как массового параллельного секвенирования на платформе Ion Torrent, так и капиллярного секвенирования.
5. Предложен дифференциальный алгоритм ДНК-диагностики для пациентов с АКПЖ, учитывающий тип ремоделирования миокарда и признаки других типов кардиомиопатий.
6. Выявление генетического варианта IV-V класса патогенности является фактором, указывающим на серьезный прогноз заболевания.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 1.5.7. «Генетика» (биологические науки), охватывающей изучение явлений изменчивости и наследственности, закономерностей процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях.

Апробация результатов

Результаты работы были представлены и обсуждены на 10 российских и 12 международных конференциях: Российских национальных конгрессах кардиологов (г.Санкт-Петербург, 25-27 сентября 2013 г.; г.Москва, 22-25 сентября 2015; г.Санкт-Петербург, 24-27 октября 2017); Конгрессах Российского общества холтеровского мониторирования и неизвазивной электрофизиологии (РОХМиНЭ) (г.Калининград, 25-26 апреля 2012 г.; г.Иркутск, 11-12 сентября 2013 г.; г.Сочи, 27-28 апреля 2016 г., Онлайн-конференция, 12-13 октября 2020 г.); IV Всероссийской конференции «Противоречия современной кардиологии: спорные и

нерешенные вопросы» (г.Самара, 16-17 октября 2015 г.); IX Съезде Российского общества медицинских генетиков (г.Москва, 30 июня - 2 июля 2021 г.); VII Российском Конгрессе лабораторной медицины (РКЛМ) (г.Москва, 19-21 октября 2021 г.); Международных конгрессах по электростимуляции и клинической электрофизиологии сердца "КАРДИОСТИМ" (г.Санкт-Петербург, 18-20 февраля 2016 г.; г.Санкт-Петербург, 15-17 февраля 2018 г.); Международных научно-практических конференциях «NGS в медицинской генетике» (г.Суздаль, 25-27 апреля 2018 г.; г.Суздаль, 28-30 апреля 2021 г.); Конференциях Европейского общества генетики человека (the European Society of Human Genetics Conference) (г.Париж, Франция, 8-11 июня 2013 г.; г.Гетеборг, Швеция, 15-18 июня 2019 г.; Онлайн-конференция, 6-9 июня 2020 г.); Международной конференции по каналопатиям «Channelopathy Meeting 2016» (г.Париж, Франция, 15-17 июня 2016 г.); Конгрессе «HEART FAILURE 2017» Европейского общества кардиологов (г.Париж, Франция, 29 апреля-2 мая 2017 г.); 14-м Международном симпозиуме по вариантам генома «Детекция, секвенирование и интерпретация» проекта Human Variome (г.Сантьяго-де-Компостела, Испания, 5-7 июня 2017 г.); 45-ом Конгрессе Международного общества электрокардиологии (ISE) и 18-ом Конгрессе Международного общества холтеровского мониторирования и неизвазивной электрокардиологии (ISHNE) (г.Белград, Сербия, 30 мая - 1 июня 2019 г.); 12-ой Международной конференции «Биоинформатика геномной регуляции и структурной/системной биологии» (BGRS-SB 2020) (Онлайн-конференция, 6-10 июля 2020 г.).

Апробация работы проведена 25 мая 2021 года на межотделенческой конференции в ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского».

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практику медико-генетического консультирования, диагностический и лечебный процесс лаборатории медицинской генетики и отделения хирургического лечения сложных нарушений ритма сердца и электрокардиостимуляции, а также в программы непрерывного дополнительного профессионального образования ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского».

Результаты ДНК-диагностики включены в клиническую классификацию АКПЖ, которая была внедрена в лечебный и учебный процесс Факультетской терапевтической клиники имени В.Н. Виноградова и кафедры факультетской терапии № 1 ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

Публикации

По теме диссертации опубликованы 76 научных работ, включая 23 статьи, из них 18 в изданиях, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, и 5 статей, индексируемых в базах данных Scopus и/или Web of Science, и 53 тезиса научной работы в материалах конференций.

Личный вклад автора в проведение исследования

Автору принадлежит ведущая роль в разработке и выполнении молекулярно-генетических исследований, биоинформатическом анализе результатов секвенирования, статистической обработке, ведении регистра биологических образцов пациентов, анализе и обобщении полученных данных, включая клинические данные, предоставленные профильными клиническими учреждениями.

Автору принадлежит ведущая роль в подготовке статей, тезисов и докладов по теме исследования. Представление и обсуждение результатов работы на конференциях выполнены автором лично.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах печатного текста и состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, библиографического списка (217 источников литературы: 7 отечественных и 210 иностранных), 2 приложений. Диссертация иллюстрирована 25 таблицами и 31 рисунком.

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Значение и биологические функции десмосом

Целостность тканей имеет решающее значение для поддержания гомеостаза живых организмов. Развитие многоклеточных организмов в процессе эволюции привело к клеточной специализации, дифференцировке и морфогенезу. Способность многоклеточных эукариот создавать связи между клетками обеспечивается процессом клеточной адгезии посредством специализированных соединительных белковых комплексов - межклеточных контактов.

Среди межклеточных контактов выделяют 1) плотные контакты, которые регулируют межклеточный транспорт и предотвращают диффузию мембранных белков; 2) щелевые контакты, обеспечивающие прямой перенос ионов и небольших молекул между соседними клетками; 3) адгезивные контакты, связывающие актиновый цитоскелет примыкающих друг к другу клеток; 4) десмосомы, связывающие промежуточные филаменты соседних клеток. Десмосомы представляют собой наиболее распространенный тип адгезивных межклеточных контактов в тканях позвоночных [5].

Десмосомы как компоненты клеточной адгезии были впервые описаны во второй половине XIX в. патологом Джулио Бидзодзеро, термин «десмосома» (от греч. *desmos* – связь, *soma* - тело) был введен в 1920-х годах. Ультраструктура десмосом показала многослойные симметричные дискообразные структуры диаметром 0,2–0,5 мкм, расположенные вдоль клеточных мембран соседних клеток [6].

Десмосомы представляют собой сложные белковые структуры клеточной мембраны, которые обеспечивают структурную и функциональную целостность клеток в различных типах тканей, в том числе в миокарде. Десмосомы наиболее развиты в тканях, подверженным частым механическим воздействиям. Десмосомы были обнаружены в клетках кожи, сердца, слюнных желез, щитовидной железы, желудка, печени, поджелудочной железы, кишечника, желчного пузыря, матки, эпителиальных клетках нефронов. Десмосомные белки представлены тремя семействами белков: 1) кадгеринами (десмоглеин, десмоколлин); 2) плакинами (десмоплакин); 3) белками семейства *armadillo* (плакофилин, плакоглобин) (Рис. 1).

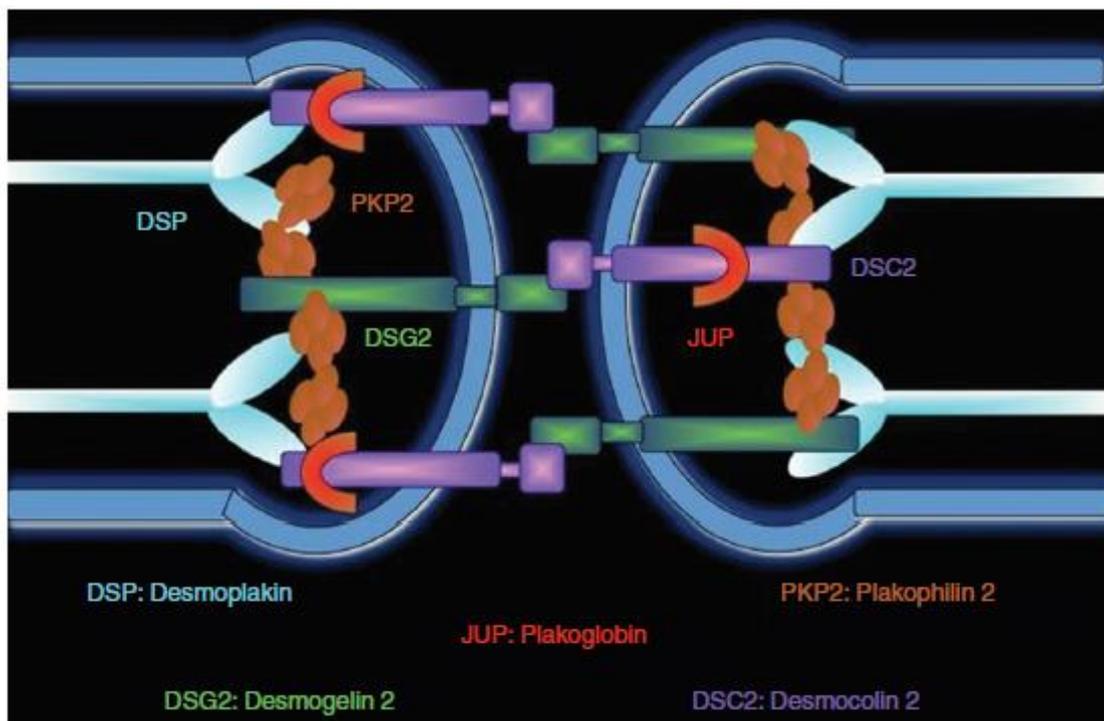


Рисунок 1. Белки, являющиеся основными компонентами десмосом млекопитающих, и кодирующие их гены [7].

Десмосомы образуют многофункциональные и многокомпонентные сети, связанные с регуляторными белками, такими как киназы [8]. Кроме того, десмосомы выполняют сигнальные функции, необходимые для процессов развития, морфогенеза тканей и ремоделирования тканей. В последнее время накапливаются сведения об участии компонентов десмосомы в регуляции клеточной сигнализации и развития рака [9].

Важность десмосом в поддержании целостности тканей в организме человека подчеркивается немалым числом заболеваний, ассоциированных с нарушениями их функции. Среди них наследственные заболевания эпидермиса и миокарда, а также аутоиммунное заболевание пемфигус (пузырчатка). В этом контексте не-десмосомные регуляторные молекулы приобретают все больший интерес для изучения, что приводит к расширению десмосомного интерактома, названного «десмо-адгезом». Пространственно-временные изменения в экспрессии и регуляции десмо-адгезома лежат в основе ряда генетических, инфекционных, аутоиммунных и злокачественных заболеваний (Таблица 1) [10].

Таблица 1. Заболевания, затрагивающие компоненты десмосом [10], ред.

EDSFS - Эктодермальная дисплазия, синдром ломкости кожи; LA-EB - летальный акантолитический буллезный эпидермолиз; LDAC - леводоминантная аритмогенная кардиомиопатия; РРК - пальмоплантарная кератодерма; SAM - кожный дерматит,

множественные аллергии и синдром метаболического истощения; SPPK - полосатая пальмоплантарная кератодерма; н/д – нет данных.

Таргетный белок (молекулярный вес, кДа)	Распространение в ткани	Генетическое заболевание
Десмоглеин 1 (160)	Многослойный плоский эпителий	SPPK, SAM
Десмоглеин 2 (122)	Все десмосома-несущие эпителии	АКПЖ
Десмоглеин 3 (130)	Многослойный плоский эпителий	н/д
Десмоглеин 4 (114)	Высоко дифференцированные слои эпидермиса: эпителий волосяных фолликул, слюнной железы, яичка, простаты и кожи	Локализованный аутосомно-рецессивный гипотрихоз; Рецессивный монилетрикс
Десмоколлин 1 (100)	Многослойный эпителий, эпителий волосяных фолликул	н/д
Десмоколлин 2 (120)	Простой и многослойный эпителий, миокард	АКПЖ, «шерстистые» волосы; кератодермия
Десмоколлин 3 (105)	Многослойный эпителий	н/д
Плакоглобин (86)	Все десмосома-несущие эпителии, миокард	Болезнь Накоса; летальный врожденный буллезный эпидермолиз
Плакофилин 1 (75)	Супрабазальные клетки эпидермиса	EDSFS, PPK
Плакофилин 2 (93-97)	Многослойный эпителий	АКПЖ, синдром Бругада
Плакофилин 3 (87)	Многослойный эпителий	н/д
Плакофилин 4 (134)	н/д	АКПЖ (редко) [11, 12]
Десмоплакин 1 (250)	Все десмосома-несущие эпителии, миокард	Синдром Карвайаль; SAM; Накос-подобная болезнь; SPPK; АКПЖ; LA-EB; LDAC
Десмоплакин 2 (220)		
Энвоплакин (210)	Многослойный эпителий и миокард	н/д
Периплакин (195)	Многослойный эпителий и миокард	н/д

Плектин (500)	Базальная поверхность базальных кератиноцитов (гемидесмосомы); в поперечно-полосатой мышце (как компонент z-линии)	н/д
---------------	--	-----

Было обнаружено, что десмо-адгезом состоит из 59 белков, связанных с мембранными и адаптерными белками, ферментами, киназами, фосфатазами и каспазами, с образованием регуляторных подсетей [13]. Многие из этих молекул, такие как PKC, Src, MAPK, рецептор эпидермального ростового фактора (EGFR) и каспазы 2/3 участвуют в сборке и разборке десмосом [14, 15]. В экспериментах *in silico* была продемонстрирована роль белка плакоглобина, одного из основных компонентов десмосом, тесно связанного с протеинкиназами (n-5) и с фосфатазами (n-4), в динамической регуляции десмосомы [8].

Десмосомы хорошо выражены в миокарде: вместе с адгезивными контактами они образуют так называемые вставочные диски (нексусы) между кардиомиоцитами. За счет наличия плотных вставочных дисков в ответ на электрическую стимуляцию соседних клеток развивается потенциал действия (ПД) рабочего кардиомиоцита.

Таким образом, благодаря системе десмосом в сердце здорового человека кардиомиоциты представляют собой синцитий - функциональное объединение большого числа тесно связанных между собой клеток. Такая структура обеспечивает распространение электрической волны по всем клеткам. При замещении кардиомиоцитов клетками фиброзной или жировой ткани синцитий разрушается, а миокард становится субстратом для возникновения аритмий.

1.2. Определение и история изучения аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (АКПЖ, MIM*#107970) – генетически детерминированное заболевание миокарда с высоким риском внезапной сердечной смерти (ВСС), характеризующееся фиброзным и/или жировым замещением кардиомиоцитов преимущественно правого желудочка (но может протекать и с вовлечением межпредсердной перегородки и/или левого желудочка), частыми желудочковыми нарушениями ритма, ведущее к развитию сердечной недостаточности [16].

Впервые заболевание было описано в 1977 г. Fontaine et al. [17]. Во время операции по лечению и картированию желудочковой тахикардии в Hôpital de La Salpêtrière (г.Париж) авторы

выявили «необъяснимые сигналы» во время эпикардального картирования, которые возникали в конце каждого комплекса QRS на ЭКГ [17]. Такие сигналы, а также сигналы в конце комплексов QRS в правых прекардиальных отведениях (V_1 - V_3), были впоследствии названы эpsilon-волной.

Заболевание стали связывать с правожелудочковой тахикардией без структурных аномалий сердца у подростков, ведущей к ВСС [1]. К заболеванию был применен термин «аритмогенная дисплазия правого желудочка» [17], а также «аритмогенная кардиомиопатия/дисплазия правого желудочка», включенный в классификацию кардиомиопатий 1996 г. [18, 19]. Выраженное истончение и жировое замещение миокарда правого желудочка позволило проводить аналогии с болезнью Уля (Uhl anomaly), описанной в 1952 г., и говорить о наследственном характере заболевания [20].

К 1982 г. Fontaine et al. было описано 24 случая заболевания [1]. В дальнейшем, было накоплено много описаний семейных случаев АКПЖ, фактор «семейный анамнез» вошел в оригинальные Европейские критерии диагностики заболевания (1994 г.) [21].

В 1994 г. Rampazzo et al. впервые провели популяционное исследование для оценки частоты встречаемости АКПЖ в северной Италии. Встречаемость случаев АКПЖ среди населения в регионе Венето составила 6:10000 человек, в регионе Пьяццола-суль-Брента – 44:10000 человек населения [22]. На сегодняшний день частота встречаемости АКПЖ в общей популяции оценивается от 1:5000 до 1:2000 человек [7, 23].

В 1994 г. Rampazzo et al. выполнили анализ сцепления для итальянских семей с АКПЖ. Максимальный показатель ($LOD = 6.04$) был посчитан для генного маркера D14S42, локализованного в локусе 14q23-q24 [22].

Severini et al. в 1996 г. выполнили анализ сцепления для 3 семей с АКПЖ разного происхождения: итальянской, словенской и бельгийской. Они указали на локус 14q12-q22, ответственный за 3 тип заболевания [24].

Для двух семей с АКПЖ Rampazzo et al. в 2003 г. секвенировали кодирующие последовательности 4 генов-кандидатов: *POMT2*, *TGFB3*, *KIAA1036*, *KIAA0759*, включая локус 14q23-q24. Белковые продукты данных генов экспрессируются в сердце. Мутаций, ассоциированных с развитием заболевания, найдено не было [25].

В 2005 г. Veffagna et al. проскринировали большую итальянскую семью с АКПЖ, первоначально изученную Rampazzo et al. [25], выявив 2 мутации: с.-36G>A в 5'-нетранслируемой области и с.1723C>T в 3'-нетранслируемой области гена *TGFB3*. В исследованиях генно-инженерных конструкций с указанными мутациями, обе мутации

показали значительно более высокую активность люциферазы по сравнению с диким типом [26].

Первым выявленным патогенным генетическим вариантом в десмосомном гене стала гомозиготная делеция с.2038_2039del в гене *JUP* (rs113994177), выявленная у пациентов с болезнью Наксоса, аутосомно-рецессивной формой АКПЖ в сочетании с пальмоплантарным гиперкератозом [27].

С 2001 г. по 2008 г. коллективами авторов были выявлены мутации в генах АКПЖ: *JUP*, *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *RYR2*, *TMEM43*, *TGFB3* [26, 28–35], включенных в диагностический список генов и базы данных генетических вариантов АКПЖ.

Впоследствии мутации в генах десмина (*DES*), титина (*TTN*), фосфоламбана (*PLN*), ламина A/C (*LMNA*) и α T-катенина (*CTNNA3*) также были обнаружены [36–40].

Тип АКПЖ, ассоциированный с мутациями в гене рианодинового рецептора *RYR2*, впоследствии был признан фенокопией АКПЖ [41].

На сегодняшний день используется термин «аритмогенная кардиомиопатия сердца», т.к. в патологический процесс могут быть вовлечены оба желудочка сердца [42]. Некоторые авторы считают, что первоначальный термин «дисплазия» более не подходит для описания кардиомиопатии, особенности и патофизиология которой генетически детерминированы [43].

На сегодняшний день АКПЖ связывают не только с нарушением структуры и функции десмосом, но и связанных с ними белков, вовлеченных в процесс клеточной адгезии, для которых в литературе употребляется название *area composita* [26, 42]. Весь белковый комплекс десмосом и связанных с десмосомами белков был назван десмо-адгезомом (Рис. 2).

Была сформулирована гипотеза, что нарушение сборки десмосом приводит к высвобождению и ядерной транслокации *jur* (плакоглобина), где он действует как конкурент β -катенина и подавляет канонический путь Wnt-сигнализации. Это приводит к усилению экспрессии генов адипогенеза и фиброгенеза и, таким образом, к переключению транскрипции с миогенеза на адипогенез [44]. Кроме того, была показана роль гликоген синтазы киназы 3 β (*GSK3b*), супрессора Wnt-сигнального пути, подавление которой приводило к предотвращению или задержке развития АКПЖ в клеточных и мышечных моделях заболевания [45].

Тип наследования АКПЖ в большинстве случаев – аутосомно-доминантный с неполной пенетрантностью. Пенетрантность при аутосомно-рецессивной форме АКПЖ (болезнь Наксоса) составляет 90% [27].

Около 80% случаев АКПЖ диагностируются у пациентов в возрасте до 40 лет; у мужчин в 3 раза чаще, чем у женщин [47].

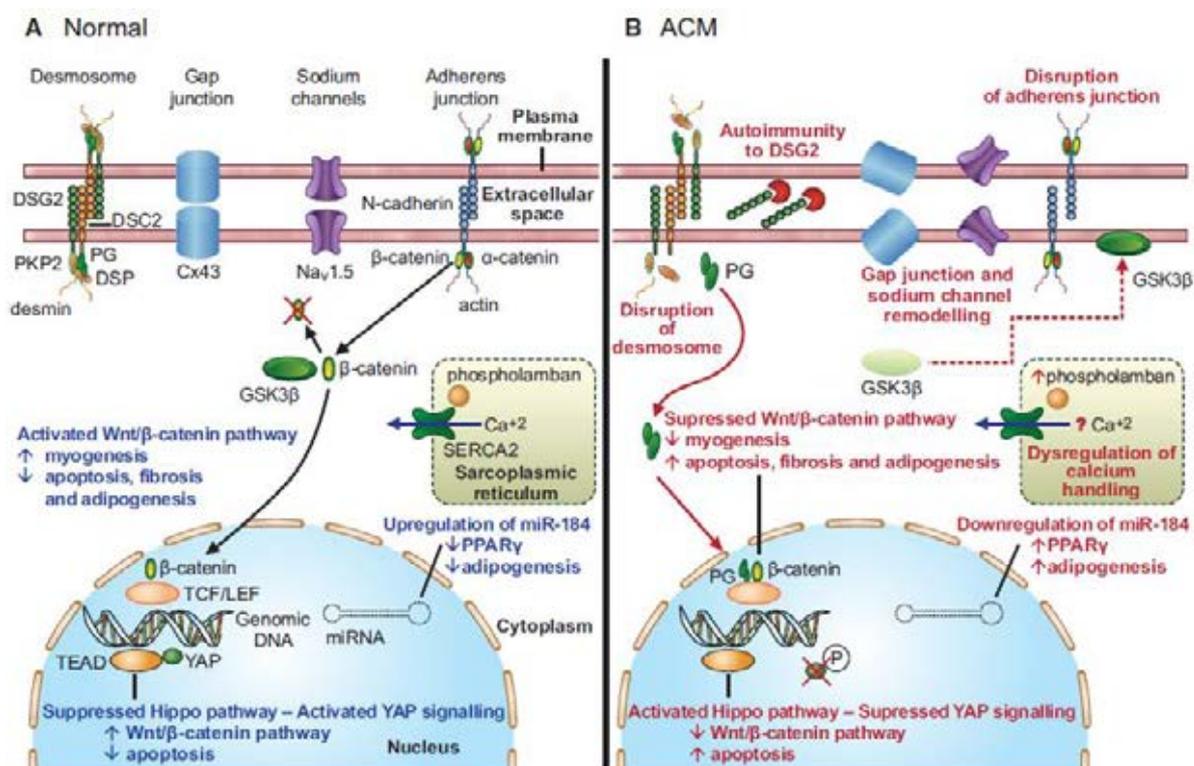


Рисунок 2. Схематичное изображение здорового кардиомиоцита (А) и кардиомиоцита при развитии АКПЖ (Б). Показаны предполагаемые механизмы развития заболевания [46].

SERCA2 - кальциевая АТФаза 2 саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума; TCF/LEF - Т-клетки/лимфоид-усиливающие транскрипционные факторы; TEAD - фактор-энхансер транскрипции TEF.

Заболевание часто диагностируется поздно, в том числе, посмертно, особенно у молодых людей или спортсменов. По результатам аутопсии гистологические признаки АКПЖ были обнаружены у 10,4-25% жертв внезапной смерти в молодом возрасте: от 17 до 40 лет [1–4]. АКПЖ, как причина внезапной смерти спортсменов, по разным оценкам составляет 20-35% всех случаев [48]. Участники спортивных соревнований страдают чаще, из-за механического напряжения, приводящего к дисфункции миокарда [49, 50]. Симптомы АКПЖ развивались в раннем возрасте у пациентов (30 ± 12 лет), которые занимались соревновательными видами спорта [51].

Более 50% случаев АКПЖ носят семейный характер [23]. В большинстве семейных случаев заболевание наследуется по аутосомно-доминантному типу, что заставляет ожидать высокой частоты случаев болезни среди кровных родственников пробанда [23].

По данным работы, опубликованной в 2020 г., более половины из всех членов семьи пробанда выполняли диагностические критерии АКПЖ и имели выявленные мутации. За более

7 лет наблюдения было отмечено сходное прогрессирование заболевания у пробандов и членов их семей. Авторы отметили, что ежегодная пенетрантность АКПЖ составила 8% [52].

1.3. Характеристика генов аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка и их белковых продуктов

В настоящее время известно 12 локусов АКПЖ (Таблица 1), идентифицированы гены и функциональные продукты их экспрессии [41, 53], установлены типы наследования.

Хотя аритмогенную кардиомиопатию называют «болезнью сердечных десмосом» [54], мутации в не-десмосомных генах также ассоциированы с развитием заболевания [41, 55]. Поиск мутаций во всех известных генах АКПЖ позволяет выявить потенциально патогенные генетические варианты примерно в 60% случаев [56].

На сегодняшний день, в список генов-кандидатов АКПЖ входят пять десмосомных генов, кодирующих белки десмосом: десмоплакин (*DSP*), плакофилин-2 (*PKP2*), десмоглеин-2 (*DSG2*), десмоколлин-2 (*DSC2*) и плакоглобин (*JUP*), и семь не-десмосомных генов, кодирующих связанные с десмосомами белки: десмин (*DES*), трансмембранный белок 43 (*TMEM43*), трансформирующий фактор роста β -3 (*TGFB3*), ламин A/C (*LMNA*), титин (*TTN*), фосфоламбан (*PLN*) и α T-катенин (*CTNNA3*) (Таблица 2, Рис 3).

Кроме того, описаны генетические варианты III-V классов патогенности в генах *SCN5A*, *FLNC*, *CDH2*, *LDB3* у пациентов с АКПЖ [50, 57–59] (Таблица 3).

Таблица 2. Гены из диагностического списка, мутации в которых ассоциированы с развитием АКПЖ [41, 53], и частоты мутаций [46].

АД – аутосомно-доминантный; АР – аутосомно-рецессивный

Ген	Локус	Белковый продукт	Частота мутаций	Тип наследования
<i>Десмосомные гены</i>				
<i>PKP2</i>	12p11	Плакофилин	20%–46%	АД, АР
<i>DSG2</i>	18q12.1	Десмоглеин	3%–20%	АД, АР
<i>DSP</i>	6p24	Десмоплакин	3%–20%	АД, АР

<i>DSC2</i>	18q21	Десмоколлин	1%–15%	АД
<i>JUP</i>	17q21	Плакоглобин	0%–1% (выше на о-ве Наксос, Греция)	АД, АР
<i>Не-десмосомные гены</i>				
<i>TMEM43</i>	3p25.1	Трансмембранный белок 43	0%–2% (выше на о-ве Ньюфаундленд, Канада)	АД
<i>PLN</i>	6q22.1	Фосфоламбан	0%–4% (выше в Нидерландах)	АД
<i>DES</i>	2q35	Десмин	0%–3%	АД
<i>LMNA</i>	1q22	Ламин А и С	0%–4%	АД
<i>TTN</i>	2q31.2	Титин	0%–10%	АД
<i>TGFB3</i>	14q24.3	Трансформирующий фактор роста β -3	Редкая	АД
<i>CTNNA3</i>	10q21.3	α Т-катенин	Редкая	АД

Таблица 3. Гены, не входящие в диагностический список, мутации в которых ассоциированы с развитием АКПЖ [57–59], и частоты мутаций [46].

Ген	Локус	Белковый продукт	Частота мутаций	Тип наследования
<i>LDB3</i>	10q23.2	LIM-связывающий домен	Редкая	АД
<i>SCN5A</i>	3p22.2	α -субъединица натриевого канала	2%	АД
<i>FLNC</i>	7q32.1	Филамин С	0%–3%	АД

<i>CDH2</i>	18q12.1	N-кадгерин	Редкая	АД
-------------	---------	------------	--------	----

Наиболее часто мутации выявляются в гене плакофилина (*PKP2*) - 20-46%, и гене десмоглеина (*DSG2*) - в 5-20% [50]. Типы АКПЖ, обусловленные мутациями в этих генах, относят к двум наиболее частым. Спектр мутаций, ответственных за развитие АКПЖ, в разных этнических группах различен. В западных странах среди носителей мутаций в генах десмосом до 70% составляют носители мутаций в гене *PKP2* [56]. В странах Азии частота мутаций в гене *DSG2* выше, чем в европейских: 15.8% в Японии [60] против 4% в Нидерландах [56].

Определена частота мутаций так же для генов десмоплакина (*DSP*) - 3%–20% и десмоколлина (*DSC2*) - 1%–15% [50].

Для остальных генов частота мутаций в генах редкая, или достоверно неизвестна.

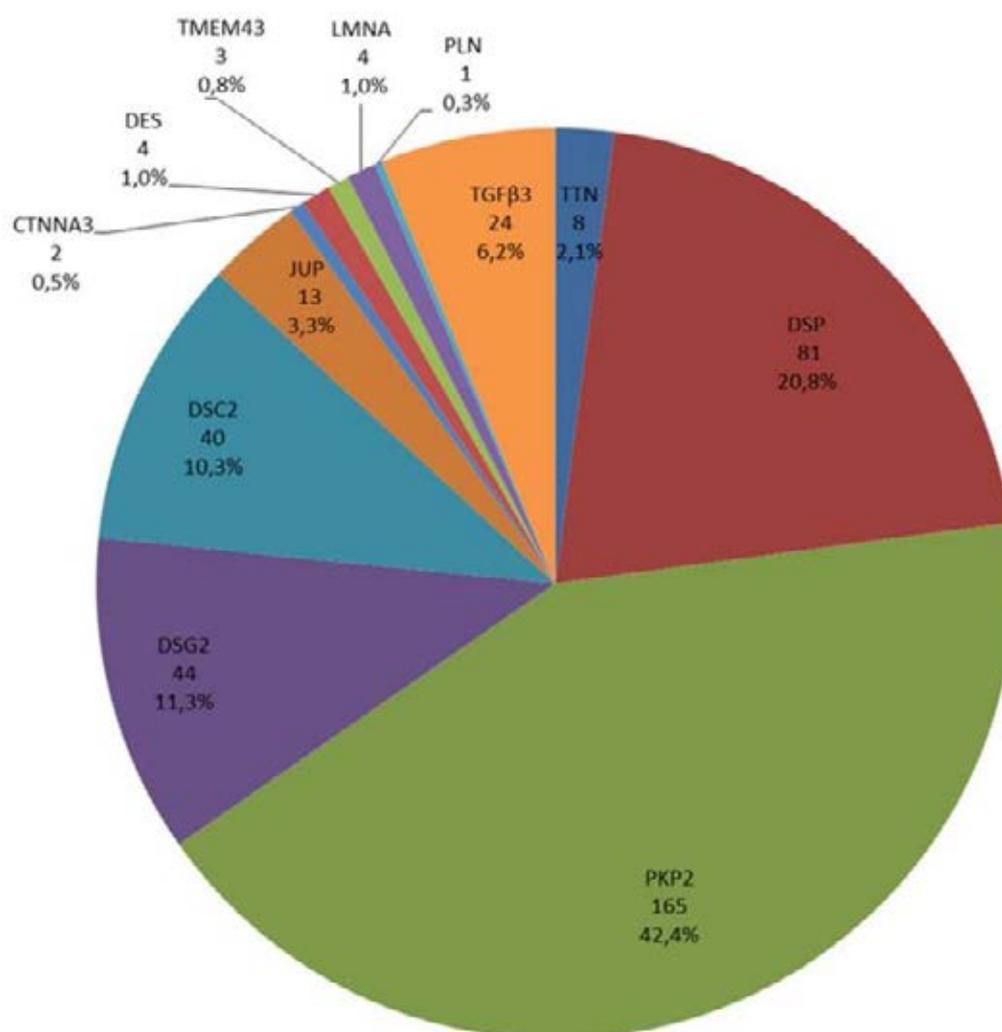


Рисунок 3. Патогенные генетические варианты в 12 генах, ассоциированных с АКПЖ, выявленные у пробандов [61].

Для некоторых мутаций известен «эффект основателя», например для мутации p.S358L в гене *TMEM43* у больных АКПЖ о-ва Ньюфаундленд (Канада), обнаруженной у представителей 15-ти неродственных семей [30]. Мутация p.C796R в гене *PKP2* обнаружена у 9 неродственных пациентов, все голландского происхождения [62].

Мутация «основателя» p.Arg14del в гене *PLN* была детектирована в Нидерландах в выборке 459 пробандов, имеющих признаки как дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) (у 13% пробандов), так и АКПЖ (у 12% пробандов) [38, 63]. С помощью анализа гаплотипов был определен возраст мутации, который оценивается между 575 и 825 годами [38].

Имеющийся на сегодня список из 12 генов-кандидатов явно не исчерпывает генетического разнообразия заболевания, так как скрининг всех известных генов позволяет выявить потенциально патогенные генетические варианты примерно у 60% больных [41, 56]. На сегодняшний день, поиск мутаций в новых генах-кандидатах у пациентов без выявленных мутаций является стратегией ДНК-диагностики.

Не-десмосомные гены кодируют белки, входящие в состав промежуточных филаментов и регуляторных факторов. Частота мутаций в не-десмосомных генах при АКПЖ низкая, в сумме составляет около 10% [41, 50], однако их обнаружение позволяет изучить генетическую гетерогенность заболевания.

База данных генетических вариантов АКПЖ (ARVD/C Genetic Variants Database, поддерживаемая Университетским медицинским центром г. Гронингена (Нидерланды) на сегодняшний день содержит 413 генетических вариантов, классифицированных как «патогенные» в 12 генах из списка генов-кандидатов АКПЖ: *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *JUP*, *TMEM43*, *TGFB3*, *LMNA*, *DES*, *PLN*, *CTNNA3*, *TTN* [53, 61].

1.3.1 Десмосомные гены PKP2, DSG2, DSP, DSC2, JUP: структура, спектр мутаций. Строение и функции белков

Наиболее распространенная форма АКПЖ обусловлена мутациями в гене *PKP2* (ENSG00000057294), который кодирует белок плакофилин-2 (*PKP2*, ENSP00000070846), основной белок семейства armadillo-белков, связанный с множеством других белков клеточной адгезии [64]. На сегодняшний день, в гене описано 157 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Изменения структуры плакофилина-2 в сердечных десмосомах нарушает взаимодействие кардиомиоцитов между собой, особенно в ответ на механический стресс [33].

По данным ряда исследований, доля патогенных генетических вариантов в гене *PKP2* составляет около 20%–46% от общего числа случаев АКПЖ [50]. Чаще всего в гене детектируют небольшие делеции/инсерции со сдвигом рамки считывания (40%), нонсенс-мутации выявляют в 25% случаев, миссенс-мутации в 20%, и мутации, ассоциированные с изменениями сайтов сплайсинга, в 15% [53]. Большинство мутаций наследуются аутосомно-доминантно, аутосомно-рецессивный тип наследования для мутаций в *PKP2* был описан в 2006 г. при идентификации новой гомозиготной делеции 7-нуклеотидов [65].

Ген *PKP2*, как ген «первой линии» диагностики, был исследован многими авторами для пациентов с АКПЖ без выявленных мутаций прямым секвенированием по Сенгеру. В 2010 г. Christensen et al. исключили крупные делеции/инсерции в датской когорте больных, используя метод MLPA [66]. В исследовании 2017 г. частота больших делеций в гене *PKP2* составила 5,7% [67].

Белок десмоглеин, кодируемый геном *DSG2*, относится к десмосомным кадгеринам. В комплексе с белком десмоколлин, данные белки составляют 2 основных трансмембранных компонента десмосом. Каждый член семейства белков DSG (типы 1-4) состоит из 4 внеклеточных кадгериновых доменов и 1 трансмембранного домена [68]. Ген *DSG2* кодирует единственный из белков, который экспрессируется в кардиомиоцитах.

Мутации в гене *DSG2* впервые были идентифицированы в 2006 г. На сегодняшний день, в гене описано 73 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Миссенс-мутации составляют около 60%, 20% - небольшие делеции/инсерции и 20% - мутации, ассоциированные с изменениями сайтов сплайсинга [53].

Ген *DSP* (ENSG00000096696) кодирует белок десмоплакин, самый распространенный белок сердечных десмосом. Самая длинная изоформа (ENSP00000369129) присутствует в сердечной ткани. В 2002 г. была впервые идентифицирована мутация в гене *DSP* [31]. Впоследствии в экспериментах Yang et al. при исследовании мутантного белка DSP было показано нарушение взаимодействия DSP–DES во вставочных дисках и заметные изменения ультраструктуры [69]. На сегодняшний день, в гене описано 216 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Около 40% составляют миссенс-мутации, 30% нонсенс-мутации, 30% - небольшие делеции/инсерции и мутации, ассоциированные с изменениями сайтов сплайсинга [53].

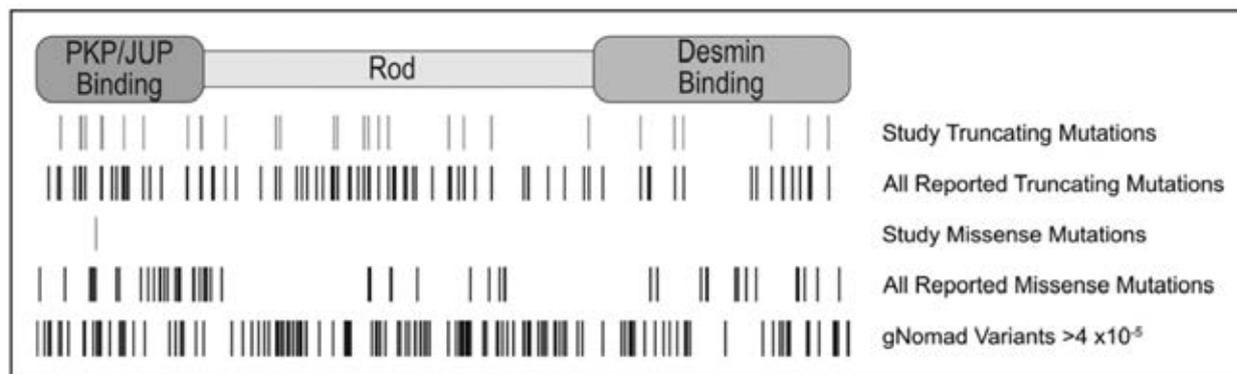


Рисунок 4. Локализация генетических вариантов в гене *DSP* [70].

В исследовании Smith et al. показано, что мутации, связанные со сдвигом рамки считывания, равномерно распределены по всему гену, тогда как миссенс-мутации преобладали в плакофилин/плакоглобин- и десмин-связывающих доменах ([70]) (Рис. 4).

Мутации в гене *DSP* определяют широкую фенотипическую гетерогенность АКПЖ, включая формы с вовлечением эпидермиса в патологический процесс. Рecessивные формы заболевания с поражением миокарда обоих желудочков и эпидермиса известны как синдром Карвайаль (Carvajal syndrome) [71, 72]. Известны клинические случаи синдрома (АКПЖ, кучерявые волосы, пемфигус), обусловленные кровным родством [73]. Такие фенотипические проявления схожи с синдромом Наксоса. У 3 пробандов с синдромом Карвайаль были идентифицированы мутации в регионе 564-597 аминокислоты, ответственном за взаимодействие десмоплакина с плакофилином/плакоглобином [74, 75].

Исследования самой большой когорты носителей мутаций в гене *DSP* показали высокую склонность к фиброзу и аритмиям левого желудочка, связь с клинической картиной воспаления миокарда, схожей с миокардитом и саркоидозом [70]. Такие выводы позволили авторам исследования выделить десмоплакиновую кардиомиопатию в отдельный тип КМП, отличный от классических АКПЖ и ДКМП [70].

Ген *DSC2* (ENSG00000134755) кодирует белок десмоколлин, один из основных компонентов десмосомной «бляшки». На сегодняшний день, в гене описано 34 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Около 50% из них – это миссенс-мутации, остальные – мутации, связанные со сдвигом рамки считывания (нонсенс-мутации, небольшие делеции/инсерции). Мутации, ассоциированные с изменениями сайтов сплайсинга, также были описаны при АКПЖ [53].

Впервые мутации в гене *DSC2* были описаны в работе Heuser et al в 2006 г., показавшими значение десмоколлина в формировании сердечной десмосомы и в раннем морфогенезе сердца [76].

Гомозиготная делеция в гене *JUP* у жителей острова Наксос (Греция) была первой выявленной генетической находкой, связанной с развитием АКПЖ [77]. Носители гомозиготной делеции с.2038_2039del обычно характеризуются преимущественно правожелудочковой кардиомиопатией, пальмоплантарной кератодермой и кучерявыми волосами. Манифестация КМП обычно происходит в подростковом возрасте, пенетрантность в более старшем возрасте составляет 100% [78–80]. На сегодняшний день, в гене описано 20 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>), около 50% - миссенс-мутации. Все остальные мутации - это вставки/делеции и одна с изменением сайта сплайсинга. Из всех известных мутации, пять - в гомозиготном состоянии [53].

Белок плакоглобин играет решающую роль в прикреплении десмосомных кадгеринов к десмоплакину и элементам цитоскелета.

1.3.2 Не-десмосомные гены *TMEM43*, *TGFB3*, *PLN*, *CTNNA3*: структура, спектр мутаций. Строение и функции белков

Ген *TMEM43* (ENSG00000170876) состоит из 12 экзонов и интронов и кодирует трансмембранный белок 43, называемый также LUMA. Ген играет важную роль в адипогенном сигнальном пути, т.к. он имеет адипогенный транскрипционный фактор - элемент пролифератора пероксисом (PPAR γ). Нарушениями в регуляции этого сигнального пути объясняют фиброзно-жировое замещение кардиомиоцитов при АКПЖ [30].

На сегодняшний день, в гене описано 6 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Трансформирующий фактор роста $\beta 3$ (ENSP00000238682) является членом семейства многофункциональных белков TGF, оказывающие разнообразные эффекты на разные типы клеток. Три структурно схожие изоформы TGF β (1, 2 и 3) были идентифицированы у разных видов млекопитающих. Трансформирующий фактор роста $\beta 3$ модулирует процессы клеточной адгезии и экспрессии десмосомных генов, стимулируя процесс фиброза [81]. На сегодняшний

день, в гене описано 27 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Ранее были идентифицированы 2 мутации в гене *TGFβ3*: в 5' и 3' нетранслируемых областях в 2 неродственных семьях [26]. Результаты исследования были опубликованы в 2005 г., до скрининга десмосомных генов. В дальнейшем, в исследованиях [26, 82] было показано, что повышенная передача сигналов TGFβ связана с мутациями в гене *JUP*.

Ген *PLN* кодирует белок фосфоламбан, фосфопротеин, тесно связанный с сердечным саркоплазматическим ретикулумом (СР). Это регулятор кальциевой помпы СР (SERCA2a) [83]. Фосфоламбан является одним из основных белков для обеспечения сердечной сократимости и расслабления [84]. На сегодняшний день, в гене описано 7 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). В исследовании [38] мутация в гене *PLN* была описана в голландской семье с АКПЖ. Изучение «частой» делеции p.R14del выявило носителей делеции как с фенотипом АКПЖ, так и с фенотипом ДКМП, что подтвердило «перекрывание» этих двух фенотипов КМП [85].

На сегодняшний день, в гене *CTNNA3* описано 2 патогенных генетических варианта (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Ген *CTNNA3* (ENSG00000183230) кодирует белок αТ-катенин. α-Катенины - это цитоплазматические молекулы, незаменимые для динамического поддержания морфогенеза тканей путем связывания в кадгерин-катениновый комплекс [86]. У млекопитающих существует три подтипа α-катенина: убиквитин зависимый αЕ-катенин, невральные αN-катенин и αТ-катенины [87].

Белок αТ-катенин расположен внутри области, состоящей из вставочных дисков кардиомиоцитов. Ген расположен в сайте, подверженном эпигенетической регуляции и транскрибируется с помощью нескольких промоторов. Состоит из нескольких транскриптов.

В 2003 году ген *CTNNA3* был исследован с целью выявления потенциальной связи с ДКМП, но мутации не были обнаружены [88]. В дальнейшем, Li et al. на животной модели продемонстрировали, как нарушение в αТ-катенине может влиять на белки плакофилин и коннексин 43, подчеркнув важность связи соединительных белков вставочных дисков между собой, и последствий таких нарушений для развития как ДКМП, так и АКПЖ [89]. Были выявлены 2 миссенс-мутации в двух неродственных семьях с АКПЖ [36].

1.3.3 Не-десмосомные гены *LMNA* и *DES*: структура, спектр мутаций. Строение и функции ламина и десмина

Ген *LMNA* имеет размер около 24000 п.н. и состоит из 12 экзонов и интронов. Альтернативный сплайсинг внутри экзона 10 приводит к двум различным транскриптам мРНК, которые кодируют преламин А и ламин С. Белки ламин А и ламин С относятся к семейству V промежуточных филаментов, которые принимают участие в образовании ядерной ламина, комплекса белков внутренней части ядерной мембраны [90]. Оба ламина А и С содержат А-спиральный домен с 360 остатками, гомологичный соответствующему α -спиральному стержневому домену, который является структурным признаком всех белков промежуточных филаментов.

Мутации в гене *LMNA* связаны с гетерогенной группой заболеваний, включая кардиомиопатии, которые носят название ламинопатий [91]. На сегодняшний день, в гене описано 298 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Связи мутаций в гене *LMNA* и АКПЖ не было описано до 2012 г., когда Quarta et al. [37] провели генетическое исследование в когорте 108 пробандов и выявили мутации. В другом исследовании миссенс-мутация в гене *LMNA* была обнаружена в когорте жертв ВСС с подозрением на кардиомиопатии, в том числе на АКПЖ [92].

Ген *DES* кодирует белок десмин, который является основным белком промежуточных филаментов в зрелых клетках скелетных и сердечных мышц. Ген *DES* состоит из 9 экзонов и интронов, имеет размер 8400 п.н. Интронные последовательности гена содержат четыре повтора AluI, а промоторная область богата G. Они образуют каркас вокруг Z-диска и связывает всю сократительную структуру с субсарколеммным цитоскелетом, вставочными дисками, ядром, компонентами цитоплазмы. Миопатия, ассоциированная с мутациями в гене *DES*, представляет собой клинически гетерогенную группу заболеваний, характеризуется признаками миопатий, кардиомиопатий, нарушениями проводимости сердца [93]. На сегодняшний день, в гене описано 71 патогенный и вероятно патогенный генетический вариант (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). В целом, 90% из них – миссенс-мутации, остальные – делеции [53].

Первое исследование мутаций в гене *DES* у пациентов с АКПЖ было опубликовано в 2009 году [40]. Позже Otten et al. сообщили, что мутация в гене *DES* воздействует на

локализацию белков плакофилина и десмоплакина во вставочных дисках [94]. АКПЖ, обусловленная мутациями в гене *DES*, обычно характеризуется поражением скелетных мышц [95].

1.3.4 Ген TTN: структура, спектр мутаций. Строение и функции титина

Белок титин (называемый также коннектином) – важнейшая составляющая сердечного саркомера, является самым большим белком в организме человека. Титин содержит большой сегмент, который представляет собой молекулярную «пружину», которая расширяется во время растяжения саркомера. Ген *TTN*, состоящий из 363 экзонов, кодирует белок титин, который участвует во многих клеточных процессах, включая поддержание структуры саркомера и силозависимую передачу сигналов [96].

На сегодняшний день, в гене описано более 1000 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Благодаря ряду исследований было показано, что мутации в гене *TTN* являются лидирующей по частоте причиной развития дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) [Dellefave et al., 2010; Franaszczyk et al., 2017]. Было показано, что у пациентов с ДКМП с мутациями в гене *TTN* чаще выявляются нарушения ритма сердца, чем у пациентов с ДКМП без мутаций в гене *TTN* [Tayal et al., 2017]. Для АКПЖ частота и спектр мутаций в этом гене не определены.

Несмотря на ключевую роль гена *TTN* в структуре кардиомиопатий, связи мутаций с фенотипом АКПЖ не было до 2011 года, когда Taylor et al. впервые сообщили о 8 миссенс-мутациях в гене *TTN* у пациентов с АКПЖ [39].

В связи с гигантскими размерами гена и главной сердечной изоформы N2BA, и с тем, что *TTN* не является геном «первой линии» диагностики АКПЖ, секвенирование данного гена для пациентов с АКПЖ в лабораториях практически не проводится, а значит, часть пациентов остаются без подтвержденного «молекулярного» диагноза АКПЖ.

1.3.5 Ген SCN5A. Строение и функции альфа-субъединицы натриевого канала

Ген *SCN5A* кодирует альфа-субъединицу белка ионного канала $Na_v1.5$, который отвечает за входящий ток натрия (INa). На сегодняшний день, в гене описано 318 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

С 1995 года было обнаружено, что мутации в гене *SCN5A* являются причиной наследственных аритмий без структурных аномалий сердца, включая синдром Бругада, синдром удлиненного интервала QT (LQTS), нарушение сердечной проводимости, синдром внезапной детской смерти (SIDS) и т.д. Однако, были описаны мутации в гене *SCN5A* у пациентов с ДКМП и АКПЖ [97, 98].

Недавние исследования подтверждают взаимодействие между десмосомой и белком натриевого канала $Na_v1.5$. Ранние исследования показали, что белок плакофилин-2 копреципитирует с $Na_v1.5$, а потеря экспрессии гена *PKP2* изменяет амплитуду и кинетику натриевого тока (INa) [99, 100].

Кроме того, была описана связь мутации в *PKP2* с фенотипом натриевой каналопатии [101], а снижение иммунореактивного белка $Na_v1.5$ было обнаружено в большинстве образцов сердца пациентов с АКПЖ [102].

Концепция тесной функциональной связи белков клеточной адгезии и $Na_v1.5$ подтверждается экспериментами, в которых $Na_v1.5$ совместно осаждается с белком N-кадгерин [100], а также результатами микроскопии сверхвысокого разрешения, демонстрирующей наличие узлов «адгезии/возбудимости», образованных агрегатами $Na_v1.5$ и N-кадгерина [103].

Te Riele et al. выявили редкий миссенс-вариант p.R1898H в гене *SCN5A* у пациента с АКПЖ, создали индуцированные кардиомиоциты, происходящие из плюрипотентных стволовых клеток (hiPSC-CM) из мононуклеарных клеток периферической крови пациента [98]. Затем генетический вариант p.R1898H в гене *SCN5A* был отредактирован с помощью технологии CRISPR/Cas9. Методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) было подтверждено снижение пикового тока Na^+ на 36%, а флуоресцентная микроскопия сверхвысокого разрешения показала пониженное содержание кластеров $Na_v1.5$ и N-кадгерина во вставочном диске [98].

Авторы исследования связывают дисфункцию $Na_v1.5$ в комплексе с молекулами клеточной адгезии со структурным фенотипом (в случае фенотипа дилатационной кардиомиопатии), электрическим фенотипом (синдром Бругада, синдром удлиненного интервала QT), или смешанным структурным и электрическим (в случае фенотипа аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка).

1.3.6 Новые гены-кандидаты АКПЖ: структура, спектр мутаций. Строение и функции белков

Локус 10q22.3, в котором расположен ген *LDB3 (ZASP)*, кодирующий LIM-связывающий белок 3, был впервые исследован у пациентов с миофибриллярной миопатией, некоторые из которых имели признаки поражения сердца [59, 104]. По результатам биопсии были выявлены миопатические изменения, окаймленные вакуоли, накопление десмина, дистрофина и других белков. На электронной микроскопии в препаратах были выявлены гранулофиламентные изменения и дезорганизация миофибрилл. У нескольких пациентов были эпизоды боли в груди или сердцебиения. У троих мужчин была диагностирована АКПЖ, зафиксированы неустойчивая желудочковая тахикардия (ЖТ), дилатация желудочков (преимущественно правого). Наследование признаков соответствовало аутосомно-доминантному типу наследования, с различной степенью поражения сердца и скелетных мышц [59, 104]. Впоследствии, были описаны мутации в этом гене у пациентов с миофибриллярной миопатией [105]. Кроме того, была показана роль белка *ZASP* в поддержании клеточной архитектоники, а ген *LDB3* предложен в качестве гена-кандидата для СНМЛЖ и ДКМП [106, 107].

Сегрегация генетического варианта с.1051A>G с АКПЖ была обнаружена в большой семье после прямого секвенирования по Сенгеру пяти генов десмосом и NGS панели из 134 генов [108].

На сегодняшний день, в гене описано 16 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

В последние годы накапливаются описания мутаций и генетических вариантов неустановленного значения (variants of uncertain significance, VUSes) в «минорных» недесмосомных генах у пациентов с АКПЖ. Помимо генов, входящих в список генов-кандидатов АКПЖ, несколько генов были предложены как возможные новые гены-кандидаты заболевания.

Генетические варианты в гене *TJP1*, который кодирует белок 1 плотных контактов были обнаружены методом полноэкзомного секвенирования в семье с АКПЖ. В дальнейшем, генетические варианты в гене *TJP1* были обнаружены у нескольких пациентов в многонациональной когорте пациентов с АКПЖ [109].

Ген *ANK2*, кодирующий белок анкирин-В был предложен в качестве гена-кандидата АКПЖ после обнаружения и сегрегации редкого генетического варианта в большой семье. Впоследствии генетические варианты в гене *ANK2* были детектированы во многих когортах больных с АКПЖ, фенотип АКПЖ был изучен на мышинной модели [110].

Poloni et al. выявили сегрегацию в семье нонсенс-мутации с.796C>T (p.R266*) в гене *TP63*, который кодирует белок p63, члена семейства транскрипционных факторов p53, ранее ассоциированных с эктодермальными дисплазиями [111].

Ortiz-Genga et al. выявили 23 мутации в гене *FLNC*, который кодирует белок филамин С, необходимый для прикрепления саркомера к плазматической мембране, у 28 пробандов с фенотипами АКПЖ (включая поражение левого желудочка), ДКМП, рестриктивной кардиомиопатии (РКМП), а также пальмоплантарной кератодермой, ко-сегрегирующей в семье с мутацией с.4127+1delG [57].

Методом секвенирования нового поколения таргетной панели генов был обнаружен генетический вариант с.1858G>C (p.A620P) в гене *PPP1R13L*, который кодирует ингибитор белка p53, стимулирующего апоптоз (iASPP), и является регулятором десмосомной целостности в цитоплазме и известным партнером TP63. Мутации в гене *PPP1R13L* были описаны у пациентов с педиатрической формой ДКМП, кардио-кожными аномалиями [112, 113].

Хотя генетический вариант с.1858G>C (p.A620P) в гене *PPP1R13L* у пациента с АКПЖ был классифицирован как вариант неустановленного значения, дальнейшее исследование этого гена в когортах больных с АКПЖ имеет важное значение.

1.4. Современные подходы к ДНК-диагностике АКПЖ. Причины ограничения эффективности ДНК-диагностики

За последние годы был достигнут огромный технический прогресс в области секвенирования ДНК, а также генотипирования по основе чипов. Эти технологии привели к новым стратегиям в анализе наследственных заболеваний [114].

Секвенирование нового поколения (Next Generation Sequencing, NGS) представляет собой экономически эффективный инструмент для выполнения масштабного генетического скрининга за короткий промежуток времени и с меньшими денежными затратами, по сравнению с прямым секвенированием по Сенгеру [115].

Генетическое тестирование с применением NGS различается по масштабу получаемых данных: от таргетных панелей генов до полноэкзомного (Whole Exome Sequencing, WES) и полногеномного (Whole Genome Sequencing, WGS) секвенирования.

На сегодняшний день, стратегия ДНК-диагностики АКПЖ основана на NGS таргетных панелей генов, полноэкзомного и полногеномного секвенирования, в результате которого обнаруживают следующие типы генетических вариантов по классификации Американской

Коллегии медицинской генетики и геномики (American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)) [116]:

- 1) патогенные генетические варианты,
- 2) вероятно патогенные генетические варианты,
- 3) генетические варианты с неустановленным значением,
- 4) вероятно доброкачественные генетические варианты,
- 5) доброкачественные генетические варианты.

С увеличением числа проанализированных последовательностей генов, вероятность обнаружения генетических вариантов с неустановленным значением возрастает значительно, чем вероятность выявления патогенного или вероятно патогенного генетического варианта. Прогнозируемый диагностический выход генетического тестирования для пациента с достоверным диагнозом АКПЖ представлен на Рис.5. При увеличении числа отсеквенированных генов для АКПЖ, процент выявленных мутаций будет примерно одинаков, тогда как процент вариантов с неустановленным значением будет заметно расти, что требует временных затрат на их интерпретацию и внесение в заключения [50].

Исходя из этих данных, сегодня большинство диагностических тестов для пациентов с АКПЖ основаны на использовании таргетных панелей генов.

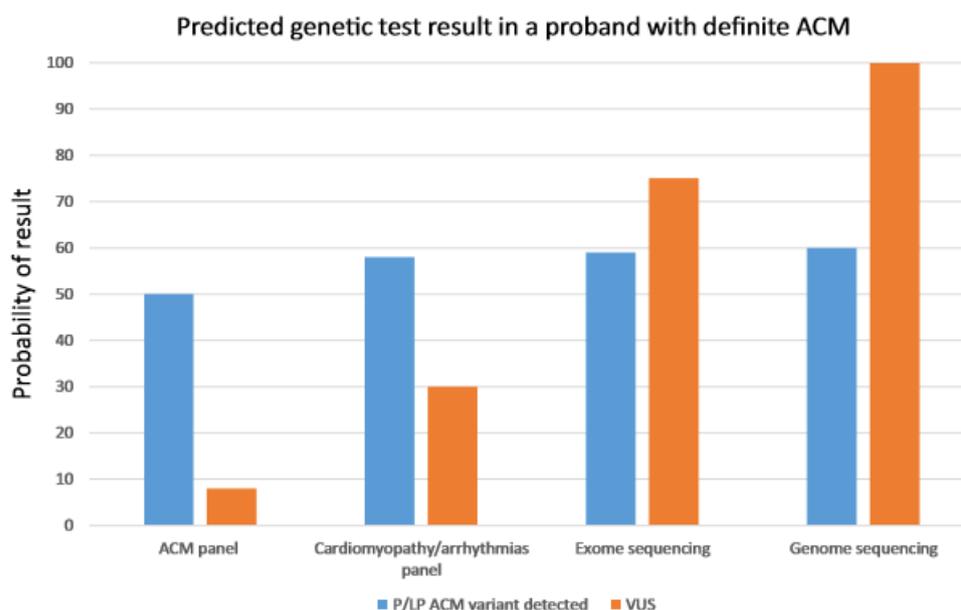


Рисунок 5. Прогнозируемый результат генетического тестирования пробанда с достоверным диагнозом АКПЖ [50].

Выделяют 3 наиболее частые причины снижения диагностической эффективности ДНК-диагностики АКПЖ [67]:

- 1) ограничение применяемых методов секвенирования, вследствие которых определенные мутации не могут быть идентифицированы (например, вариации числа копий в генах десмосом) [117, 118]; и феномен «выпадения» аллеля (allelic dropout, ADO) [119, 120]);
- 2) неправильная классификация фенотипа, «маскирующего» АКПЖ [121–124];
- 3) мутации в генах, для которых точно не установлена связь с развитием фенотипа АКПЖ или мутации в некодирующих областях известных генов АКПЖ [50].

1.4.1. Выявление вариаций числа копий в генах АКПЖ

Вариацией числа копий (Copy number variation, CNV) называют структурные варианты ДНК, в котором количество ее копий различается. Чаще всего такие генетические варианты представлены в геноме делециями и дупликациями от 1 тыс. до нескольких млн. нуклеотидов.

Первым исследованием, результатом которого стало обнаружение крупной делеции 122 тыс.п.н. на хромосоме 12p11.21, затрагивающую весь ген *PKP2*, было исследование Li Mura et al. с применением технологии SNP-чипов [117] (Рис. 6).

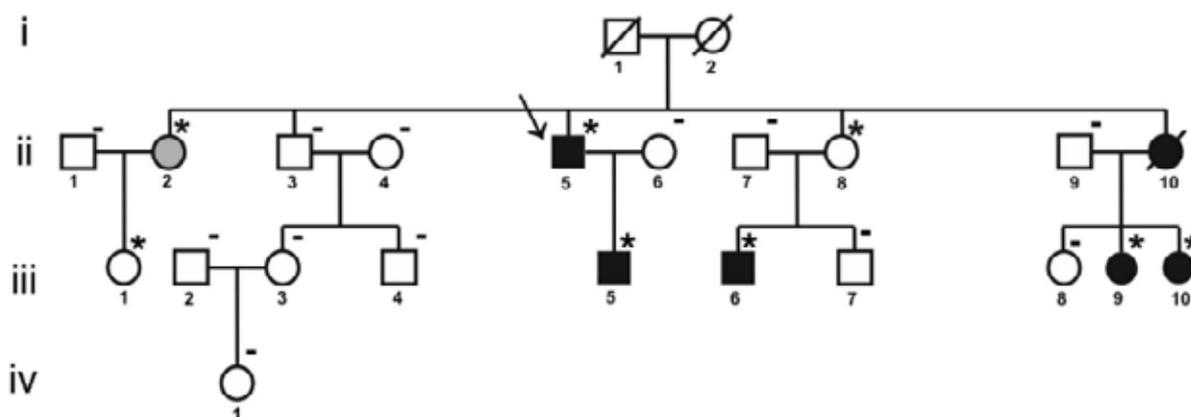


Рисунок 6. Родословная семьи с АКПЖ [117].

Пробанд обозначен стрелкой. Круги обозначают женщин; квадраты обозначают мужчин. Черные и белые фигуры обозначают пациентов с признаками заболевания и здоровых, соответственно; серая фигура – слабо выраженные признаки заболевания. Звездочками обозначены члены семьи, имеющие гетерозиготную делецию в гене *PKP2*; чертой обозначены члены семьи с нормальным числом копий гена.

В исследовании 2017 г. тщательный отбор пациентов с негативными результатами ДНК-диагностики по Сенгеру способствовал детекции больших делеций в гене *PKP2* у 2 пробандов, таким образом, частота больших делеций у пациентов в когорте с ранее отрицательными результатами ДНК-диагностики в данном исследовании, составила 5,7% [67]. В более ранних исследованиях сообщалось о частоте больших делеций от 0% в датской до 3% в голландской когортах больных [66, 118].

Помимо однонуклеотидных замен, CNVs, в частности, делеции среднего и большого размера также распространены в десмосомных генах: до 4% в исследовании 2019 г. [125].

Сегодня для детекции и подтверждения CNVs применяют следующие методы и подходы:

- 1) полноэкзомное секвенирование (гетерозиготная делеция подозревается, если нормализованное покрытие меньше одного стандартного отклонения (SD) распределения среднего покрытия для всей когорты);
- 2) Количественная ПЦР в реальном времени (qPCR);
- 3) Метод мультиплексной амплификации лигированных зондов (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification, MLPA);
- 4) технология микрочипов.

Для вариаций числа копий, как и для «точковых» генетических вариантов, интерпретацию полученных результатов проводят с подсчетом критериев патогенности и присвоении класса патогенности каждому выявленному варианту [116, 126].

Выявление вариаций числа копий у пациентов с АКПЖ подтверждает важность выполнения дополнительного поиска возможных делеций/дупликаций в геноме у пациентов без обнаруженных «точковых» мутаций в генах-кандидатах АКПЖ.

1.4.2. Явление «выпадения» аллеля - частый феномен, снижающий точность ДНК-диагностики

Каждый метод, используемый для проведения ДНК-диагностики, имеет известные ограничения, о которых детально не упоминается в современных руководствах по генетическому тестированию больных и интерпретации генетических вариантов. При проведении масштабного скрининга когорт больных, внутренний лабораторный контроль за методическими ограничениями применяемых технологий обычно снижается.

Одним из распространенных явлений, ограничивающих диагностическую эффективность ПЦР-опосредованного секвенирования ДНК диплоидного организма, является «выпадение» аллеля (allelic dropout, ADO).

Явление «выпадения» аллеля представляет собой избирательную амплификацию аллелей в ходе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Присутствие однонуклеотидного генетического варианта (single nucleotide variant, SNV) в области прямого и/или обратного праймера может привести к амплификации только одного аллеля (гемизиготное состояние), второй аллель в ходе ПЦР «выпадает», т.е. не амплифицируется. В таких случаях SNP обычно локализован ближе к 3' концу праймера [127].

Методы прямого секвенирования по Сенгеру и высокопроизводительного полупроводникового секвенирования с использованием панелей генов являются ПЦР-опосредованными. Поэтому ADO оказывает непосредственное влияние на распознавание (коллирование) выявленных генетических вариантов, диагностический выход и интерпретацию результатов ДНК-диагностики.

Явление потери аллеля, или allelic dropout, впервые было описано в 1991 г. как «частичное непрохождение амплификации», представляющее потенциальную проблему корректной ДНК-диагностики как доминантных, так и рецессивных заболеваний, в зависимости от того, амплифицируется ли аллель дикого типа или мутантный [128]. Практическая значимость данного феномена была впервые показана Lissens W. и Sermon K. в 1997 году на примере преимплантационной диагностики муковисцидоза, когда оказалось, что гетерозиготная мутация $\Delta F508$ в гене *CFTR* не была распознана из-за потери аллеля в 25% мутантных бластомеров [129].

На сегодняшний день, ADO является известным ограничением практически всех методов молекулярной диагностики, основанных на анализе последовательностей, полученных методом ПЦР. В ходе ПЦР исключительно/преимущественно амплифицируется только 1 аллель исследуемого локуса, который впоследствии секвенируется в гемизиготном состоянии. Таким образом, в результатах секвенирования наблюдается завышенное число наблюдаемых гомозигот [130].

Выделяют 2 вида причин возникновения феномена ADO [130] (Рис. 7):

I. «Образец-специфичные» причины, обусловленные обычно качеством ДНК-матрицы или ее низкой концентрацией. К ADO в таких образцах может приводить:

1) присутствие одного из аллелей в количестве, недостаточном для его успешной амплификации, вследствие чего сигнал от него на хроматограмме может находиться на уровне фонового шума;

2) превалирование при гибридизации олигопраймера с матрицей стохастических эффектов, что усугубляется, если исследователь для повышения концентрации ПЦР-продукта увеличивает число циклов ПЦР [131].

Такие случаи ADO встречаются в судебной диагностике, где зачастую доступна только фрагментированная, деградированная ДНК, а также, в преимплантационной диагностике, где генотипирование производится по ДНК одного бластомера. В последнем случае ADO может наблюдаться как в случае неравновесной амплификации аллелей, так и в случае истинной гемизиготности бластомера по исследуемому локусу вследствие его делеции при дроблении [132].

II. «Локус-специфичные» причины, обусловленные особенностями исследуемого локуса при нормальном количестве ДНК. Присутствие SNV в зоне отжига прямого и/или обратного праймера нарушает специфичность комплементарного взаимодействия олигонуклеотида с матрицей, не происходит гибридизации праймера и элонгации ампликона. При наличии SNV «выпадение» аллеля в праймер-связывающем сайте в гомозиготном состоянии вероятность амплификации снижается одинаково для обоих аллелей, в результате чего искомым фрагмент ДНК в ПЦР-продукте может отсутствовать или присутствовать в количестве много меньше ожидаемого (снижение эффективности амплификации). При гетерозиготной замене в зоне посадки праймера амплифицируется только один аллель, что приводит к картине ложной гомозиготности на хроматограмме [127].

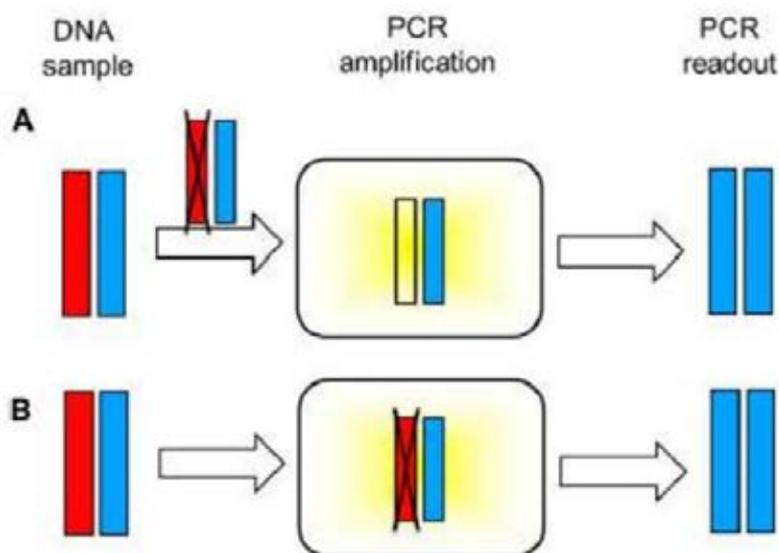


Рисунок 7. Две причины возникновения феномена «выпадения» аллеля [130].

Красным и синим прямоугольниками обозначены две аллельные копии участка ДНК.

А: Отсутствие одного из аллелей в количестве, достаточном для его успешной амплификации.

В: Избирательная амплификация только одного аллеля при нормальном количестве ДНК-матрицы ввиду особенностей исследуемого локуса.

Избирательная амплификация аллелей может опосредоваться формированием вторичной структуры «шпильки» в ампликоне [133], а также третичной структуры G-квадруплекса, в частности, в промоторных областях генов протоонкогенов *HIF1A*, *KRAS*, *RET* [134]. Помимо этого, описаны случаи возникновения ADO за счет инсерции Alu-повтора и внутриэкзонной делеции в генах *BRCA1* и *BRCA2* [135].

Накопилось значительное число сообщений о роли ADO в формировании некорректных результатов прямой ДНК-диагностики различных заболеваний [119, 135–141], которые могут быть причиной неоптимальных рекомендаций в отношении стратегии лечения, ошибок при проведении пренатальной диагностики.

В последние годы исследователи наблюдают увеличение диагностического выхода ДНК-диагностики когорт больных в случае обнаружения методами NGS потенциально патогенных вариантов, не выявленных предшествующим секвенированием по Сенгеру. В одних исследованиях проведенный ретроспективный анализ показал, что следствием явился ADO [142, 143], в других ADO был только предположен [144].

ADO уже давно признан потенциальной проблемой ПЦР-опосредованных методов секвенирования. В Руководстве Института клинических лабораторных стандартов (CLSI) рекомендованы разработка анализа и проведение контроля качества, направленных на обнаружение и минимизацию случаев ADO [136].

В случае «локус-специфичных» ADO «причинный» SNV в праймер-связывающем сайте обычно локализован ближе к 3' концу праймера. Такая позиция сформировалась благодаря результатам работы Martins et al. в 2011 г. [127]. Авторы статьи на примере замены rs2247836 (частота минорного аллеля в европейской популяции 40,3%, в африканской популяции 32,3%) в 4 интроне фенилаланин-гидроксилазы *PAH* исследовали вероятность возникновения ADO в зависимости от расположения последовательности праймера относительно SNV. Ими были синтезированы четыре альтернативных варианта прямого праймера, фланкирующего 5 экзон гена *PAH*, содержавшие указанный SNV точно на 3'-конце, в третьем, пятом и седьмом положении от 3'-конца. С указанных праймеров было выполнено прямое секвенирование по Сенгеру пациентам, достоверно гетерозиготным по rs2247836, а также по мутации p.Arg158Gln, находящейся в 5 экзоне *PAH*. Были получены некорректные результаты: картина гомозиготности со всех праймеров. Авторами было рекомендовано при дизайне олигопраймеров как минимум 7 нуклеотидов с 3'-конца проверять на отсутствие SNV [127].

На сегодняшний день, мы наблюдаем растущую автоматизацию процессов от дизайна праймеров до распознавания генетических вариантов и их интерпретации. Без применяемых

мер при дизайне праймеров внутренний лабораторный контроль за случаями ADO снижается, а частота возникновения ADO остается достоверно неизвестной.

1.5. Клинико-инструментальная диагностика АКПЖ

На сегодняшний день, клинико-инструментальная диагностика АКПЖ включает в себя сбор жалоб и анамнеза, стандартный набор лабораторной диагностики, электрокардиограмму (ЭКГ) в 12 отведениях, суточное мониторирование ЭКГ по Холтеру, эхокардиографию (ЭхоКГ). Также пациентам с АКПЖ проводят магнитно-резонансную томографию (МРТ) сердца, и в отдельных случаях морфологическое исследование миокарда (эндомиокардиальная биопсия правого желудочка, аутопсия). МРТ считается наиболее перспективным визуализирующим методом диагностики АКПЖ, позволяющим оценить объём и систолическую функцию правого желудочка, а также обнаруживать структурные нарушения, такие как фокальное истончение стенки и локальные аневризмы.

У ряда пациентов заболевание длительное время может протекать бессимптомно (ряд авторов определяет это состояние как «скрытую фазу») [4]. Клинические признаки АКПЖ (сердцебиение, пароксизмальная тахикардия, головокружение, синкопе) обычно появляются в подростковом или юношеском возрасте. Ведущими клиническими проявлениями при этом являются жизнеугрожающие аритмии: желудочковая экстрасистолия или желудочковая тахикардия (обычно имеет морфологию блокады левой ножки пучка Гиса), в том числе с возможной трансформацией в фибрилляцию желудочков; существенно реже встречаются суправентрикулярные нарушения ритма (предсердные тахиаритмии, мерцание или трепетание предсердий).

Заболевание связано с риском внезапной сердечной смерти вследствие возникновения жизнеугрожающих аритмий. Первым проявлением заболевания может служить внезапная остановка кровообращения, которая наступает во время физических нагрузок или напряженной спортивной активности.

Лечение АКПЖ направлено на профилактику внезапной сердечной смерти за счет подавления желудочковых нарушений ритма и, при необходимости, имплантации кардиовертера-дефибриллятора (ИКД). Для этого применяются антиаритмические препараты различных групп: соталол, амиодарон, этацизин, лаптаконитин и др., а также бета-блокаторы. При частой желудочковой экстрасистолии и желудочковой тахикардии возможны попытки радиочастотной абляции (РЧА) эктопического очага, в том числе эпикардиальным доступом.

Д.м.н. Благовой О.В. и к.м.н. Лутохиной Ю.А. (Факультетская терапевтическая клиника им В.Н. Виноградова, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова) была разработана клиническая классификация аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка, основанная на особенностях клинических проявлений АКПЖ и течении заболевания [145, 146]. Были выделены 4 основные клинические формы АКПЖ:

I. Латентная аритмическая форма проявляется частой желудочковой экстрасистолией (ЖЭС) и/или эпизодами неустойчивой ЖТ в отсутствие устойчивой ЖТ. Основной дифференциальный диагноз при этой клинической форме следует проводить с идиопатической ЖЭС и миокардитом. Данная клиническая форма характеризуется отсутствием фатальных аритмических событий и летальных исходов, а также относительно высокой эффективностью РЧА (71%), по сравнению с другими формами [145, 146].

II. Развернутая аритмическая форма характеризуется наличием устойчивой ЖТ/ФЖ. Дифференциальный диагноз проводился с ишемической болезнью сердца, каналопатиями, некомпактным миокардом (НКМ) и миокардитом. Для этой формы типичны высокая частота оправданных срабатываний ИКД (75%), умеренная эффективность РЧА (60%) и высокая летальность (18%) [145, 146].

III. АКПЖ с прогрессирующей хронической сердечной недостаточностью (ХСН): ХСН является ведущим клиническим проявлением. При данной клинической форме основной дифференциальный диагноз проводился с первичной дилатационной кардиомиопатией (ДКМП), легочным сердцем (включая тромбоэмболию легочной артерии) и миокардитом. Частота срабатываний ИКД при этой форме составила 50% vs 25% в группе сравнения. АКПЖ с прогрессирующей ХСН отличалась от других форм относительно нечастой ЖЭС, однако у половины пациентов регистрировалась устойчивая ЖТ [145, 146].

IV. АДПЖ в сочетании с НКМ. Данная форма отличается агрессивными желудочковыми нарушениями ритма и максимальной частотой оправданных срабатываний ИКД (100% vs 33% в группе сравнения). Основной дифференциальный диагноз проводился с изолированным НКМ, первичной ДКМП и миокардитом [145, 146].

На сегодняшний день существует проблема дифференциального диагноза между активным миокардитом и АКПЖ. В исследовании Chimenti et al. пациентам с клиническим диагнозом АКПЖ по результатам эндомикардиальной биопсии (ЭМБ) был подтвержден диагноз только в 30% случаев, в 70% случаев были обнаружены признаки активного миокардита [147].

Кроме того, АКПЖ может сочетаться с миокардитом: частота сопутствующего миокардита при данном типе кардиомиопатий превышает 70% и, что немаловажно, лечение миокардита у этой категории пациентов позволяет достоверно улучшить прогноз [148].

1.5.1. Диагностические критерии АКПЖ

В отсутствие единого диагностического признака, патогномоничного для АКПЖ, в 1994 г. группой под руководством McKenna et al. была разработана диагностическая система больших и малых диагностических критериев [21].

В настоящее время клинический диагноз АКПЖ ставится на основе пересмотренных критериев диагностики АКПЖ 2010 г. [149] и основан на выявлении структурных, функциональных и электрофизиологических нарушений, вызванных и/или отражающих лежащие в основе гистологические изменения. Пересмотренные критерии классифицируют диагноз заболевания как «достоверный», «вероятный» и «возможный» на основании следующих категорий: глобальная или региональная дисфункция миокарда, замещение миокарда фиброзно-жировой тканью, электрокардиографические нарушения реполяризации/деполяризации, желудочковые аритмии, отягощенный семейный анамнез и выявленные патогенные генетические варианты [149] (Таблица 4). Диагноз АКПЖ считается *достоверным* при наличии 2 больших критериев либо 1 большого и 2 малых критериев либо 4 малых критериев из разных категорий. Диагноз АКПЖ является *вероятным* при наличии 1 большого и 1 малого либо 3 малых критериев из различных категорий. *Возможным* диагноз АКПЖ является при наличии 1 большого либо 2 малых критериев из разных категорий [149].

Таблица 4. Диагностические критерии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка [149].

Категория	Большие критерии	Малые критерии
I. Глобальная/ региональная дисфункция и структурные изменения	<p><i>при ЭхоКГ:</i></p> <p>1) региональная акинезия, дискинезия или аневризма правого желудочка</p> <p>2) и один или более признак (конец диастолы):</p> <ul style="list-style-type: none"> • ПЖ (длинная ось) ≥ 32 мм (индекс ≥ 19 мм/м²) • ПЖ (короткая ось) ≥ 36 мм 	<p><i>при ЭхоКГ:</i></p> <p>1) региональная акинезия или дискинезия правого желудочка</p> <p>2) и один или более признак (конец диастолы):</p> <ul style="list-style-type: none"> • ПЖ (длинная ось) 29–31 мм (индекс 16–18 мм/м²) • ПЖ (короткая ось) 32–35 мм (индекс 18–20 мм/м²)

	<p>(индекс ≥ 21 мм/м²)</p> <ul style="list-style-type: none"> • или региональные нарушения $\leq 33\%$ <p><i>при МРТ:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) региональная акинезия или дискинезия, или диссинхрония сокращения правого желудочка 2) и один или более признаков: <ul style="list-style-type: none"> • отношение конечного диастолического объема (КДО) ПЖ к поверхности тела ≥ 110 мл/м² (у мужчин) или ≥ 100 мл/м² (у женщин) • или фракция выброса (ФВ) правого желудочка $\leq 40\%$ <p><i>при вентрикулографии правого желудочка:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • региональная акинезия, дискинезия или аневризма правого желудочка 	<ul style="list-style-type: none"> • или региональные нарушения 34–40% <p><i>при МРТ:</i></p> <ol style="list-style-type: none"> 1) региональная акинезия или дискинезия, или диссинхрония сокращения правого желудочка 2) и один или более признаков: <ul style="list-style-type: none"> • отношение КДО ПЖ к поверхности тела 100–109 мл/м² (у мужчин) и 90–99 мл/м² (у женщин) • или ФВ правого желудочка 41–45%
II. Гистология	сохранные миоциты $< 60\%$ при морфометрическом анализе (или $< 50\%$ при точной оценке) с фиброзным замещением миокарда свободной стенки правого желудочка в ≥ 1 участке, с жировым замещением ткани (при эндомикардиальной биопсии) или без него	сохранные миоциты 60–75% при морфометрическом анализе (50–65% при точной оценке) с фиброзным замещением миокарда свободной стенки правого желудочка в ≥ 1 участке, с жировым замещением ткани (при эндомикардиальной биопсии) или без него
III. Нарушения реполяризации	инверсия зубцов Т в правых грудных отведениях (V1–V3) или дальше у лиц старше 14 лет (в отсутствие полной блокады правой ножки пучка Гиса с шириной QRS ≥ 120 мс)	<ul style="list-style-type: none"> • инверсия зубцов Т в отведениях V1–V2 у лиц старше 14 лет (в отсутствие полной блокады правой ножки пучка Гиса) или в V4–V5 или в V6 • инверсия зубцов Т в отведениях V1–V4 у лиц старше 14 лет при наличии полной блокады правой ножки пучка Гиса
IV. Нарушения деполаризации/ проведения	эпсилон-волна (воспроизводимый низкоамплитудный сигнал между окончанием комплекса QRS и началом зубца Т) в правых грудных отведениях (V1–V3)	<ol style="list-style-type: none"> 1) поздние потенциалы желудочков (по 1–3 параметрам) на сигнал-усредненной ЭКГ в отсутствие расширения QRS ≥ 110 мс на стандартной ЭКГ: 2) фильтрованная длительность QRS ≥ 114 мс 3) продолжительность конечной части QRS (длительность низкоамплитудного сигнала) ≥ 38 мс 4) RMS вольтаж конечной части QRS ≤ 20 мВ

		5) продолжительность конечной активации QRS ≥ 55 мс (от вершины зубца S до конца QRS, включая R' в отведениях V1, V2 или V3 при отсутствии полной блокады правой ножки пучка Гиса)
V. Аритмии	неустойчивая или устойчивая желудочковая тахикардия с морфологией блокады левой ножки пучка Гиса и верхней осью (отрицательные или неопределенные комплексы QRS в отв. II, III, aVF и положительные в отв. aVL)	1) неустойчивая или устойчивая желудочковая тахикардия из выводного тракта правого желудочка или с морфологией блокады левой ножки пучка Гиса и нижней осью (положительные комплексы QRS в отв. II, III, aVF и отрицательные в отв. aVL) или неизвестной осью 2) более 500 желудочковых экстрасистол (ЖЭС) в сутки (холтеровское мониторирование)
VI. Семейный анамнез	1) АКПЖ у родственников первой степени (согласно критериям диагноза) 2) АКПЖ, подтвержденная морфологически, у родственников первой степени 3) идентификация у самого пациента патогенных мутаций с доказанной или вероятной связью с АКПЖ	1) АКПЖ у родственников первой степени (когда невозможно определить, удовлетворяют ли члены семьи критериям диагноза) 2) Внезапная сердечная смерть (в возрасте до 35 лет) вследствие предполагаемой АКПЖ у родственников первой степени 3) АКПЖ, подтвержденная морфологически или согласно критериям диагноза у родственников второй степени

В 2020 г. группа экспертов из Медицинской школы Университета Падуа выпустила новые критерии диагностики заболевания [150]. Авторы критериев доказывают, что фиброзно-жировое замещение миокарда представляет собой отличительную фенотипическую особенность заболевания, поражающее миокард обоих желудочков (в ряде случаев поражение левого желудочка (ЛЖ) превышает поражение ПЖ), изучить которую удалось с использованием аутопсии и МРТ с контрастным усилением. Новые диагностические критерии представляют собой обновление критериев 2010 г. и введение новых критериев для диагностики аритмогенной кардиомиопатии левого желудочка (АКЛЖ), которые нуждаются в дальнейшей валидации в будущих клинических исследованиях на больших группах пациентов [150].

1.5.2. Полиморфизм клинических проявлений АКПЖ. Комплексные фенотипы кардиомиопатий

Первичные кардиомиопатии (КМП) относят к прогрессирующим заболеваниям миокарда и характеризуют разнообразием симптомов и риском внезапной сердечной смерти. Благодаря развитию клинико-инструментальных методов диагностики признаки сочетаний разных типов КМП (комплексные фенотипы) все чаще диагностируются в клинике.

Современная классификация АКПЖ [151] включает следующие фенотипические варианты АКПЖ, которые не ограничиваются только «классическим» правожелудочковым: фенотипом:

- 1) классический «право-доминирующий» вариант, который характеризуется преимущественным поражением ПЖ, без/с незначительным поражением ЛЖ;
- 2) вариант «бивентрикулярной» формы заболевания, характеризующийся параллельным поражением ПЖ и ЛЖ;
- 3) «аритмогенный левожелудочковый» вариант, также известный как АКЛЖ, который характеризуется преимущественным поражением ЛЖ, без/с незначительного поражения ПЖ.

Кроме вариативности фенотипических вариантов АКПЖ, известно о «перекрывании» фенотипов АКПЖ с другими типами кардиомиопатий.

На сегодняшний день, описано «перекрывание» клинических фенотипов между синдромом Бругада и АКПЖ. В статье 2005 г. [152] выделяется группа пациентов с АКПЖ с ЭКГ-паттернами, характерными для синдрома Бругада. В других статьях описаны пациенты с синдромом Бругада и мутациями в гене *SCN5A* с признаками фиброзно-жировой инфильтрации ПЖ [153, 154].

В последние годы накоплено много данных о мутациях в гене *SCN5A* у пациентов с кардиомиопатиями. Впервые мутация в гене *SCN5A* была выявлена у пациента с ДКМП в 2003 г.; с тех пор обнаружен ряд мутаций у пациентов с ДКМП с нарушением ритма и проводимости (тип 1E). Впоследствии, мутации в гене *SCN5A* были выявлены и у пациентов с АКПЖ [97, 98]. Генетическое «перекрывание» между АКПЖ и ДКМП было обнаружено и при мутациях в других генах, ассоциированных с АКПЖ [37, 155].

Гены ДКМП кодируют гетерогенную группу белков, которые принимают участие в генерации силы, поддержании целостности саркомера, гомеостазе электролитов, функциях митохондрий, процессе транскрипции, формируют архитектуру цитоскелета и ядра. Эти гены кодируют белки, которые участвуют во многих биологических процессах кардиомиоцитов [156] (Рис. 8).

Мутация «основателя» р.Arg14del в гене *PLN* была детектирована в Нидерландах в выборке 459 пробандов, имеющих признаки как ДКМП (у 13% пробандов), так и АКПЖ (у 12% пробандов с желудочковыми аритмиями и без выявленных мутаций в десмосомных генах) [38, 63]. Существенное фенотипическое совпадение, наблюдаемое у данных пациентов, доказывает, что по крайней мере, некоторые из форм АКПЖ и ДКМП не являются различными клиническими единицами.

Более того, на поздних стадиях заболевания, трудно дифференцировать АКПЖ от идиопатической ДКМП. Авторы исследования, посвященного молекулярно-генетическому полиморфизму ДКМП, выявили мутации в десмосомных генах у 31% пациентов с диагнозом ДКМП. Такие данные демонстрируют перекрытие клинических фенотипов двух типов КМП, при которых обнаружение мутации может быть полезно для классификации и диагностики КМП [157].

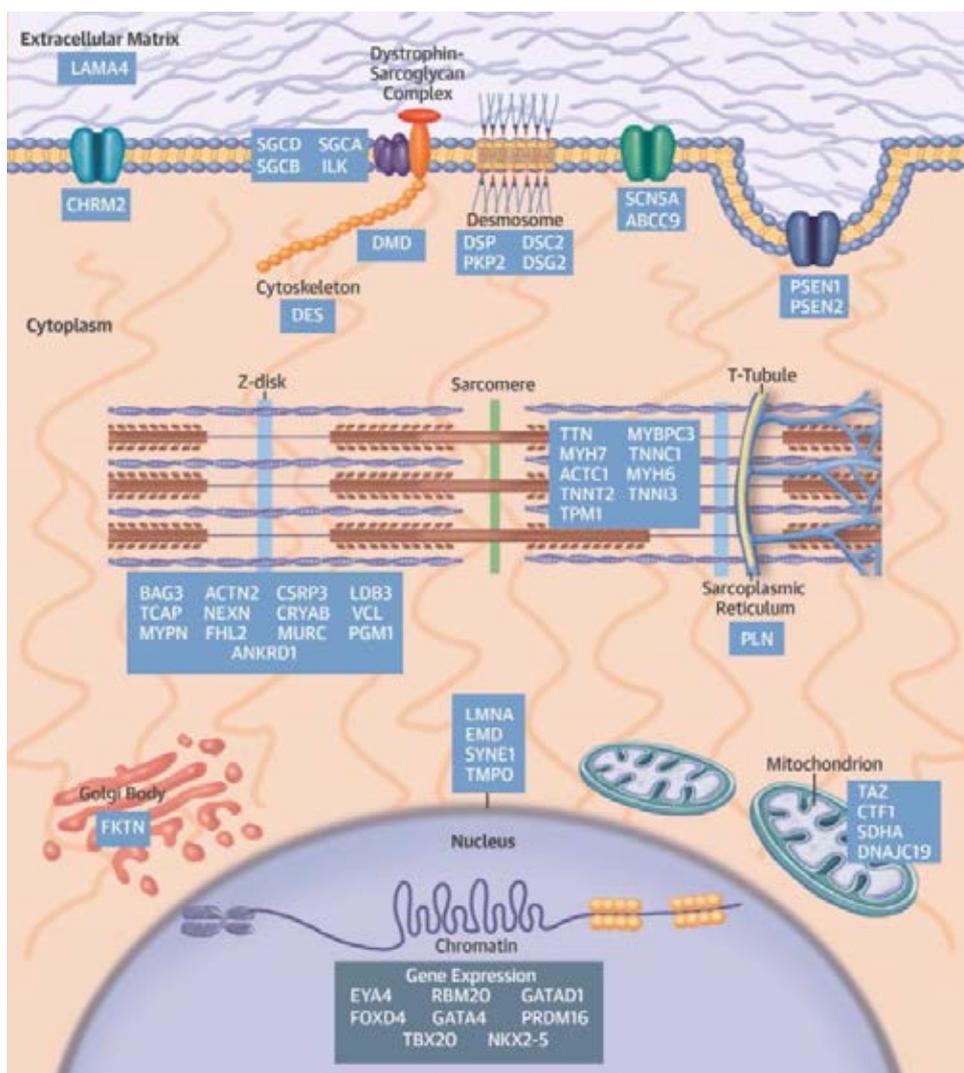


Рисунок 8. Схема генов, мутации в которых ответственны за развитие дилатационной кардиомиопатии, и субклеточная локализация кодируемых ими белков [156].

Неожиданной и уникальной находкой послужило выявление патогенного генетического варианта с.2146-1G>C, затрагивающего акцепторный сайт сплайсинга, в гене *PKP2*, ассоциированного с АКПЖ, у пациентки 61 г. с фенотипом гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП) [158]. У пациентки регистрировалась ϵ -волна на ЭКГ, которая в отсутствие других диагностических критериев, является недостаточным критерием для возможного диагноза АКПЖ. У пациентки не было структурных изменений ПЖ и доказательств фиброзно-жировой инфильтрации миокарда по данным Эхо-КГ и МРТ. Правый желудочек был в норме по размеру, толщине и функции, и не было никаких доказательств фибро-жировой инфильтрации в миокарде. Септальная гипертрофия и гипердинамика ЛЖ соответствовали диагностическим критериям ГКМП [158]. Авторы исследования полагают, что причина контрастных фенотипов моногенных заболеваний кроется именно в типах мутаций, а фенотипическая изменчивость разных типов кардиомиопатий, обусловленная одной и той же мутацией, является малоизученной [158].

Встречаемость синдрома некомпактного миокарда левого желудочка (СНМЛЖ) достоверно не определена. Частота СНМЛЖ среди взрослых пациентов, направленных на эхокардиографическое обследование, оценивается в пределах 0,014-1,3% [159]. В литературе встречаются лишь несколько описаний клинических случаев сочетания АКПЖ+СНМЛЖ, часто без результатов генетического тестирования. Сегодня изучение клинических особенностей и спектра генетических вариантов у пациентов с комплексным фенотипом кардиомиопатий представляет особый интерес.

1.6. Перспективы лечения сердечно-сосудистых заболеваний на генном уровне

Сегодня большие надежды в качестве новой стратегии лечения сердечно-сосудистых заболеваний возлагаются на технологию редактирования генома CRISPR-Cas9. В 1987 году группой японских ученых была описана система CRISPR у *Escherichia coli* как 29-нуклеотидные повторы, разделенные 32-нуклеотидными спейсерами. Система CRISPR-Cas9 – это система защиты бактерий, используемая для борьбы с вторгающимися вирусами. Позже были открыты белки Cas, обладающие способностью расщеплять ДНК на две цепи. По сравнению с другими методами редактирования генома с применением нуклеаз типа «цинковые пальцы» (Zinc-finger nucleases, ZFNs) и эффекторных нуклеаз-активаторов транскрипции (TALENs), система

CRISPR-Cas9 является наиболее простой и эффективной, что позволяет одновременно редактировать несколько генов [160].

Система редактирования генома CRISPR-Cas9 состоит из двух компонентов: эндонуклеазы и короткой последовательности РНК. Последние 20 нуклеотидов геномной РНК используются в качестве идентификатора последовательности ДНК и проведения эндонуклеазы Cas9 к таргетному участку. Затем Cas9 разрезает ДНК на 3–4 п.н. выше последовательности PAM. После двухцепочечного расщепления ДНК, повреждение корректируется одним или двумя основными путями репарации: гомологично направленной репарацией (Homology Directed Repair, HDR) и негомологичным соединением концов (Non-Homologous End Joining, NHEJ) (Рис. 9) [160].

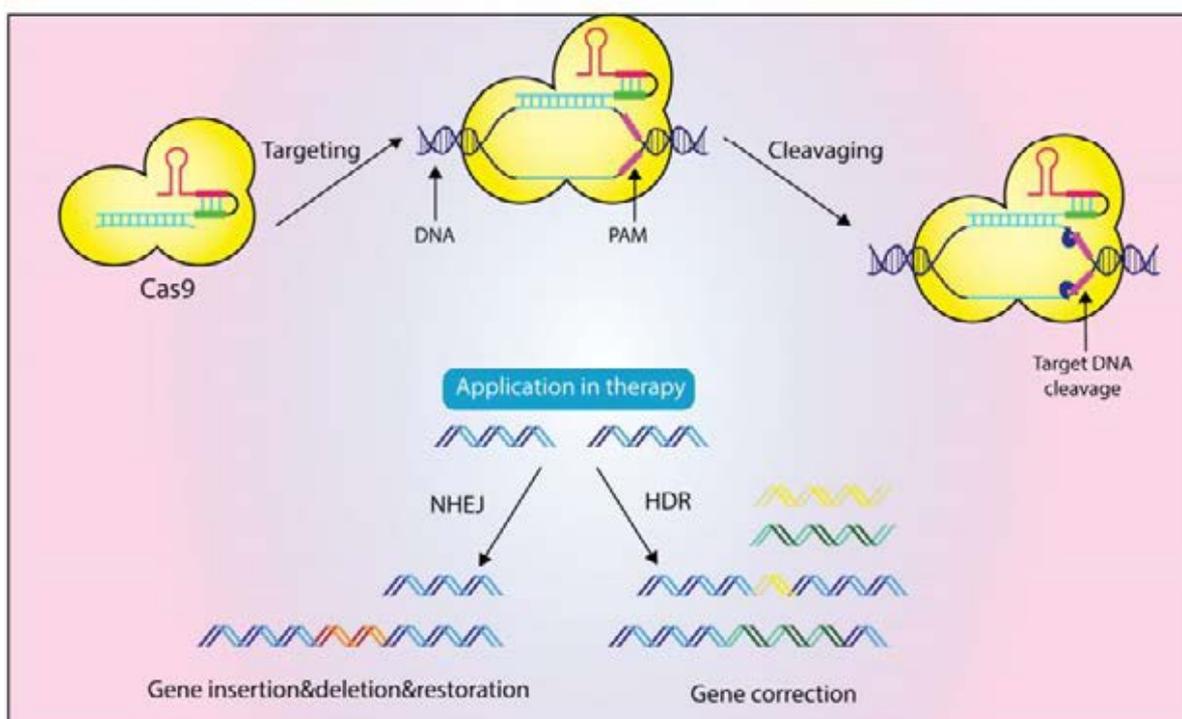


Рисунок 9. Схема компонентов CRISPR-Cas9 и их применение в геномной терапии [160].

При применении метода NHEJ расщепление двойной спирали ДНК восстанавливается с помощью коротких делеций и вставок. Исследователи используют этот метод для того, чтобы индуцировать мутацию и деактивировать ген.

Механизм метода HDR, который связан с меньшим количеством ошибок, - это использование шаблона, или «темплейта», таким образом, удаляется или дублируется именно фрагмент целевого гена, а также происходит вставка внешнего фрагмента другого гена в интересующий сайт генома [161].

В недавнем исследовании мутация в гене *MYBPC3* была целенаправленно изучена с использованием CRISPR-Cas9 для исправления в человеческом эмбрионе с гипертрофической кардиомиопатией [162]. Интересно, что такие результаты были намного эффективнее (72,2%), чем при использовании индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) (17,61–27,9%) [162].

Технология CRISPR-Cas9 использовалась для редактирования мутаций в гене *DMD*, кодирующем белок дистрофин, путем удаления экзонов через скиппинг (пропуск) экзона. Методом NHEJ были проведены доклинические исследования на мышах по удалению и восстановлению экзонов в гене *DMD*, мутации в котором связаны с развитием миодистрофии Дюшенна [163]. Данная технология обеспечивает возможность получения мутантных мышей всего за один этап, включая одновременную инъекцию в ростки мРНК Cas9, различных single-guide RNA (sgRNA) и ДНК доноров [164].

Получены результаты исследования Limpitikul et al. по редактированию мутации, связанной с синдромом удлиненного интервала QT (LQTS): ингибировании мутантного аллеля с.389A>G (p.D130G) в гене кальмодулина 2 (*CALM2*) в iPSC-CM [165].

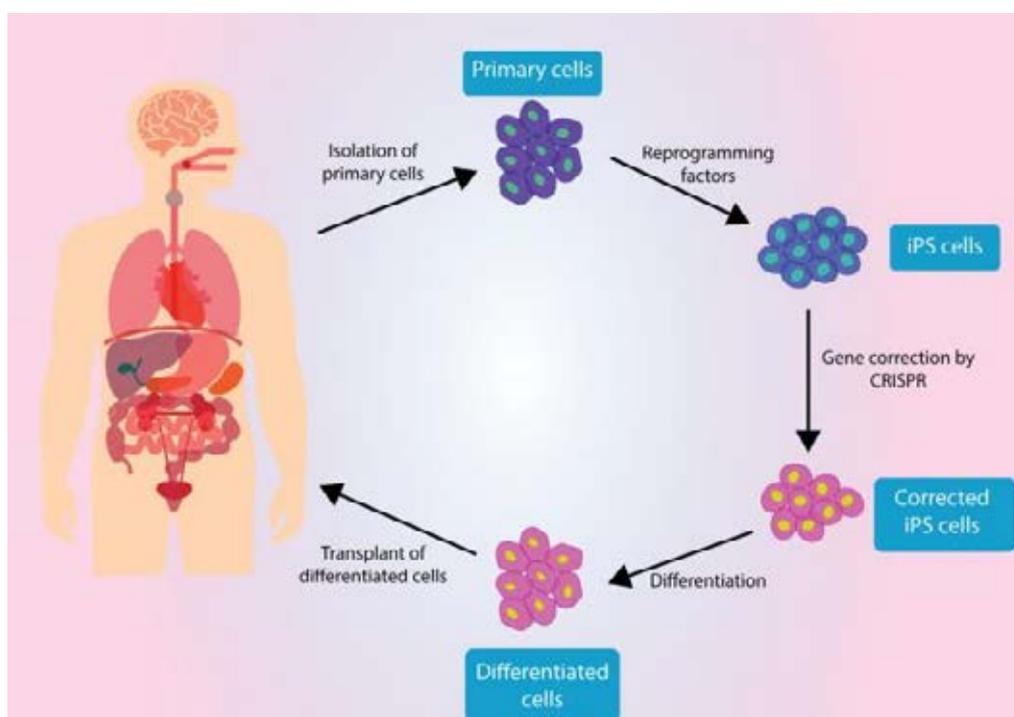


Рисунок 10. Применение CRISPR в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Соматические клетки, извлеченные из пациента, индуцируются в iPSC в процессе перепрограммирования, затем на них выполняется генетическая модификация с помощью CRISPR. Затем на модифицированных клетках запускается процесс дифференциации, который в конечном итоге передается пациенту [160].

С использованием технологии PiggyBac (PB), основанной на использовании высокоэффективного транспозона, выделенного из *Trichoplusia ni*, обеспечивается эффективная транспозиция в клетках млекопитающих с возможностью множественного манипулирования геномом хозяина [166]. Успешный результат коррекции был достигнут в четырех сайтах, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (гены *ADRB2*, *GRK5*, *RYR2* и *ACTC1*) со следующими показателями: геномное расщепление 8–93%, эффективность коррекции 67–8%, дифференциация в высокочистые кардиомиоциты с сохраненной плюрипотентностью 88–99% [167].

Кочергин-Никитский et al. использовали CRISPR/Cas9 для нокаута аллелей гена *DES*, несущих гетерозиготные gain-of-function мутации: наибольшая средняя эффективность при использовании sgRNA в комбинации с eSpCas9(1.1) составила 2,22% (до 8,06%) [168].

Система CRISPR-Cas9 может использоваться в терапевтических целях, не только путем корректирования мутаций, связанных с заболеванием, но и путем введения защитных мутаций и нацеливания на вирусные геномы [169].

Успешный нокаут аллеля с известной делецией p.Arg14del в гене *PLN* при АКПЖ был получен методом NHEJ в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках (iPSC). Полногеномное секвенирование исходных и отредактированных iPSC показало низкий уровень индукции нецелевых двуниевых разрывов ДНК. Кардиомиоциты, полученные из отредактированных iPSC, демонстрировали нормальный фенотип в отличие от контрольных нередктированных клеток [170].

Таким образом, система CRISPR-Cas9 может рассматриваться как мощный инструмент для исследования и как новая стратегия лечения сердечно-сосудистых заболеваний (Рис. 10) [160].

Глава 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Настоящая работа была выполнена в лаборатории медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского».

Генетическое исследование проведено в соответствии с протоколом, утвержденным Локально-Этическим Комитетом ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского (Протокол № 135), и с нормами Хельсинкской декларации (1964 г.), и ее последующими пересмотрами.

От всех совершеннолетних пациентов было получено добровольное письменное информированное согласие на участие в исследовании и дальнейшее использование полученных данных в научных целях. За несовершеннолетних согласие было подписано родителем или официальным опекуном.

2.1. Структура выборки больных

В исследуемую группу вошли 80 пробандов: средний возраст на момент обращения за ДНК-диагностикой - $38,7 \pm 14,4$ л.; 36 М. В исследование были включены пробанды с достоверным (N=46; средний возраст $40,7 \pm 15,1$ л.; 24 М), вероятным (N=24; средний возраст $35,0 \pm 12,5$ л.; 11 М) и возможным (N=10; средний возраст $37,8 \pm 14,4$ л.; 1 М) диагнозами АКПЖ, поставленным до проведения ДНК-диагностики на основании диагностических критериев АКПЖ 2010 г. [149].

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК 80 пробандов, и 16 их кровных родственников, включенные в банк биологических образцов лаборатории медицинской генетики ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского с 2010 по 2020 гг.

Среди родственников пробандов соотношение по полу составило 1:1; родителей пробандов было 11 человек, детей пробандов – 5 человек.

Для анализа корреляции «генотип-фенотип» были проанализированы доступные данные по пробандам и их родственникам, которые проходили обследование в рамках госпитализации в ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского или амбулаторно (направлены из других учреждений: ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России). Средний

срок динамического наблюдения за пробандами составил 73 мес. (минимальный – 7 мес., максимальный 11 л.). Семейные, клинико-инструментальные данные были предоставлены врачами специализированных центров, в которых пациенты были консультированы, диагностированы, пролечены и находятся под динамическим наблюдением:

- результаты медико-генетического консультирования: первичная и повторная (по результатам проведенной ДНК-диагностики) консультации, родословные (с учетом случаев ВСС);
- результаты клинико-инструментального обследования: ЭКГ покоя, 24-часовое мониторирование по Холтеру, трансторакальная эхокардиография (Эхо-КГ), рентгенография органов грудной клетки, биопсия миокарда (у части больных), МРТ сердца с контрастным усилением (у части больных), мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) сердца (у части больных), определение уровня антимиеокардиальных антител (у части больных).

Группу сравнения составили 50 пробандов (средний возраст на момент обращения за ДНК-диагностикой - $34,8 \pm 18,5$ л.; 37 М) с диагнозом дилатационной кардиомиопатии, поставленным на основании критериев [171]. Пациенты проходили обследование в рамках госпитализации в ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского или амбулаторно.

Контрольную группу составили 150 неродственных совершеннолетних доноров российского происхождения (средний возраст на момент сбора биологического материала - $31,2 \pm 9,7$ л.; 47 М), которые определяли себя здоровыми, не имели кардиальных жалоб и отягощенного по ВСС семейного анамнеза.

2.2. Молекулярно-генетическое исследование

2.2.1. Выделение ДНК из крови

Выделение ДНК из лейкоцитов свежей и замороженной периферической крови проводилось методом фенол-хлороформной экстракции [172] и с помощью стандартных наборов реагентов компаний Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA) и Zymo (Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) по протоколам производителей. Хранение образцов ДНК осуществлялось в биобанке лаборатории медицинской генетики ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского при температуре $-20/-80^{\circ}\text{C}$.

2.2.2. Дизайн оригинальных олигопраймеров и проведение амплификации исследуемых фрагментов ДНК

Для избирательной амплификации кодирующих последовательностей и прилегающих интронных областей десмосомных генов *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *JUP*, и не-десмосомных генов *TMEM43*, *LMNA*, *DES*, *TGFB3*, *PLN*, *SCN5A*, *CTNNA3*, *EMD*, *CRYAB*, *LDB3*, *FLNC* был проведен дизайн оригинальных олигопраймеров.

Предварительный расчет температур плавления осуществлялся с помощью программы PerlPrimer [173]. Специфичность выбранных пар стандартных олигопраймеров оценивалась с помощью интернет-ресурса NCBI Primer Blast [174]. Условия амплификации подбирались экспериментально.

Для оценки GC-состава ампликонов был использован онлайн-ресурс:

DNA/RNA GC Content Calculator

(<http://www.endmemo.com/bio/gc.php>)

Амплификацию исследуемых фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на программируемых амплификаторах Veriti (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) и «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Визуализация результатов ПЦР проводилась методом электрофореза нуклеиновых кислот в гелях различной плотности: 8% полиакриламидных гелях (ПААГ) и 1,5-2% агарозных гелях.

Очистка проб перед секвенированием проводилась с использованием смеси ферментов Exo-SAP-IT (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.3. Прямое капиллярное секвенирование по Сенгеру

Анализ последовательности амплифицированных фрагментов ДНК проводился методом прямого двунаправленного секвенирования по Сенгеру на автоматическом секвенаторе ABI 3730XL DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу фирмы-производителя.

2.2.4. Высокопроизводительное полупроводниковое секвенирование на платформе Ion Torrent

Для настоящей работы была внедрена технология высокопроизводительного полупроводникового секвенирования на платформе IonTorrent (прибор: Ion PGM™ System) (Thermo Fisher Scientific).

Была разработана панель генов АКПЖ «Гены кодирующие десмосомные и связанные с ними белки», включающая в себя последовательности 16 генов: *PKP2, DSG2, DSP, DSC2, JUP, TMEM43, TGFB3, LMNA, DES, EMD, CRYAB, SCN5A, FLNC, PLN, CTNNA3, LDB3*.

Также в работе была использована панель генов «Гены кодирующие саркомерные и связанные с ними белки», включающая в себя последовательности 10 генов: *MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, TPM1, MYL2, MYL3, ACTC1, TAZ, LDB3*, разработка которой была осуществлена ранее в лаборатории медицинской генетики ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского». Характеристика таргетных панелей генов и число проанализированных образцов ДНК представлены в таблице 5.

Таблица 5. Характеристика таргетных панелей генов

Панель генов	Список генов панели	Число генов	Число пар олигопраймеров	Средняя длина ампликона, bp	Среднее перекрытие ампликонов панели, bp	Размер проанализированной области, bp	Число проанализированных образцов ДНК
Панель I: Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки	<i>PKP2, DSG2, DSP, DSC2, JUP, TMEM43, TGFB3, LMNA, DES, EMD, CRYAB, SCN5A, FLNC, PLN, CTNNA3, LDB3</i>	16	521	240	30	94100	120
Панель II: Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки	<i>MYBPC3, MYH7, TNNT2, TNNI3, TPM1, MYL2, MYL3, ACTC1, TAZ, LDB3</i>	10	294	198	48	29000	16

Высокопроизводительное секвенирование было проведено с использованием готовых наборов реагентов и чипов Ion 314™ и Ion 316™ по протоколу фирмы-изготовителя (Thermo Fisher Scientific), включающему следующие этапы:

- 1) Приготовление геномных библиотек;
- 2) Клональная амплификация фрагментов библиотек на микросферах с помощью эмульсионной ПЦР для получения клонов единичных фрагментов ДНК;
- 3) Загрузка микросфер в лунки полупроводникового чипа и автоматическое секвенирование.

Пробоподготовку ампликоновых библиотек для высокопроизводительного полупроводникового секвенирования осуществляли 2-мя способами (в зависимости от задач):

I. С применением 2 таргетных панелей генов.

По технологии AmpliSeq с помощью онлайн-ресурса Ion AmpliSeq Designer® (Thermo Fisher Scientific) проведен автоматический дизайн олигопраймеров для панели генов АКПЖ «Гены кодирующие десмосомные и связанные с ними белки», фланкирующих кодирующие и прилежащие интронные области в таргетных генах. Приготовление библиотек ДНК осуществляли с помощью набора реагентов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific).

II. С применением оригинальных праймеров, подобранных с помощью программы PerlPrimer.

Для приготовления библиотек ампликонов применяли метод фрагментации библиотек ДНК с помощью набора реагентов NEBNext Fast DNA Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, USA), включающую следующие этапы:

1. Фрагментация ампликонов для получения пула фрагментированной ДНК размером ~ 200 п.н.;
2. Восстановление концов (End Repair);
3. Лигирование адаптеров для секвенирования и баркодирования;
4. Очистка;
5. Отбор необходимой фракции по размеру (Size Selection) ~ 330 п.н.;
6. Краткая амплификация отобранной фракции для повышения выхода библиотеки;
7. Финальная очистка.

2.2.5. Полноэкзомное секвенирование

Полноэкзомное секвенирование было проведено для одного образца ДНК (post-mortem) в ООО «ЦГРМ «Генетико» на приборе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina Inc., USA).

Интерпретацию и валидацию генетических находок проводили в лаборатории медицинской генетики ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского».

Выявленные у пробандов генетические изменения методом NGS были подтверждены методом прямого двунаправленного секвенирования по Сенгеру.

2.3. Биоинформатический анализ результатов

2.3.1. Обработка и визуализация результатов секвенирования

Визуализацию результатов прямого двунаправленного секвенирования по Сенгеру проводили при помощи программы «Chromas 2» (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia).

Данные высокопроизводительного полупроводникового секвенирования обрабатывали с помощью пакета программного обеспечения Torrent Suite Software (версия 5.0.5), сервиса аннотации генетических вариантов Ion Reporter (Thermo Fisher Scientific, USA) и визуализатора Integrative Genomic Viewer (IGV) (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) [175] с использованием hg19 в качестве референсного генома.

Материал и применяемые методы для получения и визуализации результатов секвенирования суммированы в таблице 6.

Таблица 6. Материал и применяемые методы для получения и визуализации результатов секвенирования.

Материал	ДНК пациента (из венозной крови)		
	Праймеры для ПЦР	Праймеры для прямого секвенирования по Сенгеру	Праймеры для прямого секвенирования по Сенгеру
Приготовление образцов	Библиотеки AmpliSeq	Библиотеки ампликонов	Протокол ПЦР
Платформа для секвенирования	Ion Torrent	Ion Torrent	Прямое секвенирование по Сенгеру
Визуализация результатов секвенирования	Integrative Genomic Viewer	Integrative Genomic Viewer	Chromas

2.3.2. Название и интерпретация генетических вариантов

Для названия генетических вариантов использовалась стандартная номенклатура HGVS (Human Genome Variation Society) (<http://varnomen.hgvs.org/>).

Референсные последовательности генов были взяты из базы данных NCBI RefSeq (hg19/hg38). Номера референсных последовательностей представлены в таблице 7.

Для проверки названия генетических вариантов был использован пакет программ Mutalyzer (<https://mutalyzer.nl/>).

Таблица 7. Номера референсных последовательностей (NCBI RefSeq) кДНК генов *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *JUP*, *TMEM43*, *LMNA*, *DES*, *TGFB3*, *PLN*, *SCN5A*, *CTNNA3*, *EMD*, *CRYAB*, *LDB3*, *FLNC*, *TTN*, *MYH7*, *MYBPC3*, *TPM1*, *TNNT2*, *TNNI3*, *ACTC1*, *TAZ*, *MYL3*, *MYL2*, которые использовались при анализе результатов секвенирования.

№	Ген	Изоформа кДНК (NCBI RefSeq)
1	<i>PKP2</i>	NM_004572.3
2	<i>DSG2</i>	NM_001943.5
3	<i>DSP</i>	NM_004415.4
4	<i>DSC2</i>	NM_024422.6
5	<i>JUP</i>	NM_001352773.1
6	<i>TMEM43</i>	NM_024334.3
7	<i>LMNA</i>	NM_170707.4
8	<i>DES</i>	NM_001927.4
9	<i>TGFB3</i>	NM_003239.4
10	<i>PLN</i>	NM_002667.5
11	<i>SCN5A</i>	NM_198056.2
12	<i>CTNNA3</i>	NM_013266.4
13	<i>EMD</i>	NM_000117.3
14	<i>CRYAB</i>	NM_001289807.1
15	<i>LDB3</i>	NM_007078.3
16	<i>FLNC</i>	NM_001458.4
17	<i>TTN</i>	NM_003319.4
18	<i>MYH7</i>	NM_000257.4
19	<i>MYBPC3</i>	NM_000256.3

20	<i>ACTC1</i>	NM_005159.5
21	<i>TNNT2</i>	NM_001276345.2
22	<i>TNNI3</i>	NM_000363.5
23	<i>TAZ</i>	NM_000116.5
24	<i>TPM1</i>	NM_001018005.2
25	<i>MYL2</i>	NM_000432.4
26	<i>MYL3</i>	NM_000258.3

Для оценки патогенности все выявленные генетические варианты с частотой минорного аллеля <3%, указанной в базах данных The Genome Aggregation Database (gnomAD), Exome Sequencing Project (ESP), 1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium (ExAC), были охарактеризованы с использованием рекомендаций Американской Коллегии Медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии (ACMG) [116], Руководства по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [126], литературных и биоинформатических данных.

Для интерпретации критерия PVS1 использованы рекомендации Abou Tayoun et al., 2018 [176]. Для интерпретации генетических вариантов в гене *MYH7* были использованы адаптированные к гену рекомендации Kelly et al., 2018 [177].

Для подсчета критериев патогенности генетических вариантов были использованы следующие онлайн-ресурсы и калькуляторы патогенности:

- 1) Калькулятор патогенности вариантов нуклеотидной последовательности (<http://calc.generesearch.ru/>)
- 2) InterVar-Genetic variants Interpretation by ACMG/AMP 2015 (wintervar.wglab.org)
- 3) Cardio Classifier v0.2.0 (<https://www.cardioclassifier.org/>)

Корректировка критериев патогенности для каждого генетического варианта осуществлялась вручную.

Для оценки функциональной значимости выявленных нуклеотидных замен, их потенциального влияния на сплайсинг, структуру белка были использованы следующие базы данных генетических вариантов и онлайн-ресурсы:

ARVD/C Genetic Variants Database

(<https://molgenis136.gcc.rug.nl/>)

Leiden Open Variation Database 3.0 (LOVD)

(<http://www.lovd.nl/3.0/home>)

Genome Aggregation Database (gnomAD)

(<https://gnomad.broadinstitute.org/>)

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

(www.ncbi.nlm.nih.gov/)

ENSEMBL database

(<https://www.ensembl.org/index.html>)

The UCSC Genome Browser

(<http://genome.ucsc.edu/index.html>)

The Universal Protein Resource

(UniProt) (<http://www.uniprot.org/>)

VarSome: The Human Genomic Variant Search Engine

(<https://varsome.com/>)

Cardiovascular Genetics and Genomics

(<https://www.cardiodb.org/>)

The Gene Connection For The Heart

(<http://www.fsm.it/cardmoc/>)

1000 Genomes | A Deep Catalog of Human Genetic Variation

(www.1000genomes.org/)

POLYPHEN-2

(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

SIFT

(<http://sift.jcvi.org/>)

NetGene2 Server

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>)

BDGP: Splice Site Prediction by Neural Network

(http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)

GeneSplicer

(<https://ccb.jhu.edu/software/genesplicer/>)

HOPE

(<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope/>)

NMD Esc Predictor

<https://nmdprediction.shinyapps.io/nmdescpredictor/>

По результатам проведенного анализа генетическим вариантам присваивались классы патогенности от I до V. Общепринятая характеристика и описание классов патогенности отражена в Таблице 8 и используется в настоящей работе в соответствии с руководствами [42, 116, 126].

Таблица 8. Классификация генетических вариантов [42].

Класс патогенности	Описание	Вероятность патогенности варианта
Класс V	патогенные генетические варианты	>95%
Класс IV	вероятно патогенные генетические	>90%

	варианты	
Класс III	генетические варианты неустановленного значения	10-90%
Класс II	вероятно доброкачественные генетические варианты	<10%
Класс I	доброкачественные генетические варианты	<5%

Для патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов мы также применяли исторический термин «мутации».

2.3.3. Выявление случаев «выпадения» аллеля

Для отслеживания потенциальных случаев «выпадения» аллеля (ADO) полученные по результатам высокопроизводительного секвенирования файлы (BAM, VCF), визуализированные в Integrative Genomic Viewer (IGV), сравнивали с хроматограммами прямого секвенирования по Сенгеру, визуализированными в программе Chromas 2.1, с отметкой всех случаев возможной потери гетерозиготности или недопредставленности альтернативных аллелей.

Все архивные хроматограммы прямого секвенирования по Сенгеру и файлы высокопроизводительного секвенирования библиотек ампликонов были использованы для отслеживания случаев потенциального ADO.

Для выявления причин ADO, были проанализированы сайты связывания прямого и обратного праймеров с использованием базы данных The Genome Aggregation Database (gnomAD) [178]. Для исключения амплификации только одного аллеля, ампликоны со случаями потенциального ADO были ре-секвенированы с альтернативной пары праймеров.

2.4. Анализ выявленных генетических вариантов в группах пациентов и здоровых доноров

2.4.1. Сегрегационный анализ

Сегрегационный анализ был проведен с использованием биологического материала кровных родственников пробандов.

По запросу семей был выполнен каскадный скрининг родственникам пробандов с выявленными генетическими вариантами IV-V классов патогенности.

Поиск генетических вариантов у кровных родственников пробандов проводился методами прямого двунаправленного секвенирования по Сенгеру или ПЦР-ПДРФ анализа.

Подбор эндонуклеазы рестрикции осуществлялся с помощью интернет-ресурса Restriction Mapper v.3 (<http://www.restrictionmapper.org/>).

2.4.2. Анализ частот выявленных генетических вариантов в контрольной группе здоровых доноров

Анализ частот выявленных генетических изменений проводился методом ПЦР-ПДРФ на образцах ДНК, полученных от 150 неродственных совершеннолетних доноров российского происхождения.

2.4.3. Анализ выявленных генетических вариантов в группе пациентов с ДКМП

Анализ спектров выявленных генетических вариантов проводился в группе пациентов с ДКМП, включающей в себя 50 пробандов, диагноз «ДКМП» которым был поставлен на основании критериев [171]. Пациенты проходили обследование в рамках госпитализации в ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского или амбулаторно. Всем 50 пробандам было проведено секвенирование панели генов АКПЖ «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки» с последующим подтверждением по Сенгеру выявленных генетических вариантов.

2.4.4. Анализ частоты минорного аллеля генетического варианта p.S194L в гене DSG2 в контрольной группе здоровых доноров и больных из Биобанка РНЦХ

Анализ частоты минорного аллеля с.581C>T (p.S194L) в гене *DSG2* был проведен в группе 150 российских здоровых доноров, включая 20 здоровых доноров из р. Дагестан (биологический материал любезно предоставлен к.б.н. Раджабовым М.О.), а также в группе 200 больных из Биобанка РНЦХ, предположительно кавказского происхождения, со следующими диагнозами при поступлении:

1) кардиомиопатия (АКПЖ, ДКМП, ГКМП, НКМ, РКМП); 2) нарушение ритма сердца (включая синдром Бругада, синдром удлиненного интервала QT); 3) врожденный порок развития (ВПР) сердца; 4) внезапная сердечная смерть; 5) дисплазия соединительной ткани (синдром Марфана, синдром Элерса-Данло) в сочетании с признаками ДКМП; 6) патология клапанов сердца.

2.5. Статистический анализ полученных данных

Для статистического анализа полученных данных использовали пакет программ IBM SPSS Statistics v27.0 (<https://www.ibm.com/ru-ru/products/spss-statistics>).

При оценке значимости различий между двумя группами количественных показателей применяли t-критерий Стьюдента. Для всех тестов различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Для правомерности использования t-критерия Стьюдента использовали значение «значимости» критерия равенства дисперсий Ливиня.

Все количественные показатели были представлены в виде среднего и разброса максимального и минимального значений.

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Молекулярно-генетический полиморфизм аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка

Нами был изучен полиморфизм генов *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *TMEM43*, *JUP*, *TGFB3*, *PLN*, *LMNA*, *DES*, *EMD*, *SCN5A*, *LDB3*, *CRYAB*, *CTNNA3*, *FLNC*, *MYBPC3*, *TAZ*, *TPM1*, *MYL2*, *MYL3*, *ACTC1*, *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2* и проведен анализ генетических вариантов в генах, ассоциированных с развитием аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка на основании результатов секвенирования ДНК 80 пробандов. Каждому выявленному генетическому варианту был присвоен класс патогенности от I до V в соответствии с руководствами [116, 126].

В финальное заключение по результатам ДНК-диагностики, выданное пациентам, и последующий анализ были включены только генетические варианты V (патогенный), IV (вероятно патогенный), III (вариант с неустановленным значением) классов патогенности.

Генетические варианты, классифицированные как доброкачественные (I класс патогенности) и вероятно доброкачественные (II класс патогенности), с указанием частоты минорного аллеля (MAF), представлены в Приложениях 1 и 2.

По результатам исследования выявлено, что спектр доброкачественных и вероятно доброкачественных вариантов у пробандов с АКПЖ совпадает со спектром доброкачественных и вероятно доброкачественных вариантов, выявленных в группе пробандов с ДКМП.

3.1.1 Спектр выявленных каузативных генетических вариантов в генах *PKP2*, *DSG2*, *DSP*, кодирующих десмосомные белки

В гене *PKP2* было обнаружено 4 патогенных и вероятно патогенных генетических варианта в 5 неродственных семьях. Каждому генетическому варианту был присвоен класс патогенности. Все выявленные варианты связаны со сдвигом рамки считывания и механизмом гаплонедостаточности, известным механизмом для развития АКПЖ у пациентов с мутациями в гене *PKP2* [33, 179].

У двоих пробандов из выборки мы обнаружили генетический вариант c.1523_1538del. Пациентов-носителей двух и более патогенных генетических вариантов в гене *PKP2* обнаружено не было.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 9.

Генетический вариант с.1613G>A (p.W538*) в гене *PKP2*, приводящий к образованию преждевременного стоп-кодона, был неоднократно описан в семьях с выявленной сегрегацией к АКПЖ и классифицирован как патогенный генетический вариант [11, 180–183].

Таблица 9. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *PKP2* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Число пробандов	Ссылки
1	c.336+1G>T		н/д	V	1	новая
2	c.962_965del (TCGG)	p.Val321Alafs*30	н/д	IV	1	новая
3	c.1523_1538del	p.Asn508Thrfs*7	н/д	IV	2	новая
4	c.1613G>A	p.W538*	0.00001591	V	1	rs193922672

В гене *DSG2* было обнаружено 3 патогенных и вероятно патогенных генетических варианта в 4 неродственных семьях. Большинство вариантов представляли собой миссенс-варианты, связанные с заменой одной аминокислоты на другую.

У двоих пробандов кавказского происхождения из исследуемой выборки мы обнаружили генетический вариант с.581C>T (p.S194L) в гомозиготном состоянии. Пациентов-носителей двух и более патогенных генетических вариантов в гене *DSG2* обнаружено не было.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 10.

Таблица 10. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *DSG2* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Число пробандов	Ссылки
---	---------------------	-----------------	----------------------	--------------------------------	-----------------	--------

1	c.146G>A	p.R49H	0.000004008	IV	1	rs121913006
2	c.523+1G>A		0.000004201	V	1	rs553299589
3	c.581C>T/c.581C>T	p.S194L/ p.S194L	0.00002807	IV	2	rs374875442

Все выявленные генетические варианты в гене *DSG2* описаны в литературе. Генетический вариант c.146G>A (p.R49H) затрагивает консервативный и значимый для всех кадгеринов мотив Arg-X-Lys-Arg (RXKR), нарушая формирование зрелого белка [184]. Кроме того, данный генетический вариант был описан у троих взрослых членов в семье с выявленной сегрегацией к АКПЖ [185] и подтвержден *de novo* у пробанда со спорадической АКПЖ [186].

Генетический вариант c.523+1G>A в гене *DSG2* был детектирован в исследовании [187] у пробанда с АКПЖ. В нашей работе данный вариант выявлен у пробанда и ее отца с диагностированной АКПЖ.

Генетический вариант c.581C>T (p.S194L) в гене *DSG2* обнаружен нами у 2 неродственных пробандов в гомозиготном состоянии, а также у родителей одного из пробандов, являющихся двоюродными братом и сестрой, в гетерозиготном состоянии. Данный генетический вариант выявлен японскими учеными [188] у носителя в транс-положении генетического варианта p.R292C в гене *DSG2*, имеющего клиническую картину АКПЖ.

В гене *DSP* было обнаружено 6 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в 6 неродственных семьях. Все выявленные изменения представляли собой генетические варианты, связанные со сдвигом рамки считывания и механизмом гаплонедостаточности.

У двоих пробандов с достоверным диагнозом АКПЖ было обнаружено по 2 генетических варианта: патогенный генетический вариант c.2130+1G>A и вариант неустановленного значения c.273+5G>A; вероятно патогенный генетический вариант p.Y891* и вариант неустановленного значения p.P450L. Генетических вариантов, встречающихся более чем в одной семье, не было обнаружено.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 11.

Таблица 11. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *DSP* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
1	c.1141-2A>G		0.000003981	IV	rs794728111
2	c.1542dup	p.Pro515Serfs*13	н/д	IV	новая
3	c.1846C>T	p.Gln616*	н/д	IV	новая
4	c.2130+1G>A		н/д	IV	rs727505115
5	c.2672dup	p.Y891*	н/д	IV	новая
6	c.3583delins AATATAGT	p.Val1195Asnfs*8	н/д	IV	новая

В генах *DSC2* и *JUP* патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов обнаружено не было, что позволяет считать эти генетические формы АКПЖ достаточно редкими в группе российских больных.

3.1.2 Спектр выявленных каузативных генетических вариантов в генах *LMNA*, *SCN5A*, *MYBP3*, *MYH7*, кодирующих не-десмосомные белки

В гене *LMNA* был обнаружен один вероятно патогенный генетический вариант у одного пробанда. Пациентов-носителей двух и более патогенных генетических вариантов в гене *LMNA* обнаружено не было.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 12.

Таблица 12. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *LMNA* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
1	c.682_684del (GAG)	p.Glu228del	н/д	IV	новая

В гене *SCN5A* был обнаружен один вероятно патогенный генетический вариант у одного пробанда. Пациентов-носителей двух и более патогенных генетических вариантов в гене *SCN5A* обнаружено не было.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 13.

Таблица 13. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *SCN5A* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
1	c.665G>A	p.R222Q	н/д	IV	rs45546039

Генетический вариант c.665G>A (p.R222Q) в гене *SCN5A* был неоднократно выявлен у пораженных членов семьи с ДКМП, синдромом Бругада и синдромом удлиненного интервала QT [187, 189–192]. Генетический вариант p.R222Q локализован в S4 трансмембранном сенсоре домена I α -субъединицы натриевого канала $Na_v1.5$. Методом patch-clamp было установлено изменение параметров активации и инактивации мутантного канала по сравнению с каналом дикого типа. Моделирование ПД с использованием моделей волокон Пуркинье и кардиомиоцитов показало, что мутация p.R222Q приводит к частотно-зависимой эктопии волокон Пуркинье и является потенциальной причиной развития ДКМП [192].

Обнаружение данного генетического варианта у пациента с АКПЖ описано нами впервые.

В гене *MYBPC3* было обнаружено 2 патогенных/вероятно патогенных генетических вариантов в 2 неродственных семьях. Выявленные генетические варианты представляли собой изменения, связанные с механизмом гаплонедостаточности.

Интересно, что данные генетические варианты были обнаружены у пробандов с несколькими потенциально патогенными генетическими вариантами. У пациентки ARVD19 с патогенным генетическим вариантом p.Q1233* в гене *MYBPC3*, были также обнаружены вероятно патогенный генетический вариант p.R237W в гене *MYH7* и вариант неустановленного значения p.T351A в гене *LDB3*.

У пациентки ARVD54 с вероятно патогенным генетическим вариантом p.W196* в гене *MYBPC3*, были также обнаружены вариант неустановленного значения p.N1200K в гене *DSP* и вариант неустановленного значения p.T150A в гене *LMNA*.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 14.

Таблица 14. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *MYBPC3* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
1	c.587G>A	p.W196*	н/д	IV	новая
2	c.3697C>T	p.Q1233*	0.000008024	V	rs39751603 7

Генетический вариант c.3697C>T (p.Q1233*) в гене *MYBPC3*, приводящий к преждевременному стоп-кодону, был неоднократно описан в литературе. Для него была показана сегрегация с заболеванием у более чем 10 родственников пробанда с ГКМП. У всех носителей данной мутации был обнаружен либо фенотип ГКМП, либо пограничная гипертрофия миокарда [193–196]. В когорте российских пациентов в исследовании 2016 г. было выявлено 5 пробандов с данной мутацией [197].

Генетический вариант c.587G>A (p.W196*) в гене *MYBPC3*, приводящий к образованию преждевременного стоп-кодона, выявлен нами впервые.

В гене *MYH7* было обнаружено 3 вероятно патогенных генетических варианта в 3 неродственных семьях. Для интерпретации генетических вариантов в гене *MYH7* были использованы адаптированные к гену рекомендации Kelly et al., 2018 [177]. Все изменения представляли собой миссенс-варианты, связанные с заменой одной аминокислоты на другую.

У пациентки ARVD19 с вероятно патогенным генетическим вариантом p.R237W в гене *MYH7*, были также обнаружены патогенный генетический вариант p.Q1233* в гене *MYBPC3* и вариант неустановленного значения p.T351A в гене *LDB3*.

Выявленные генетические варианты и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 15.

Таблица 15. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов IV-V классов патогенности, выявленных в гене *MYH7* у пациентов с АКПЖ.

№	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
1	c.709C>T	p.R237W	0.00001193	IV	rs45516091
2	c.728G>A	p.R243H	0.000007953	IV	rs267606910
3	c.2347C>T	p.R783C	0.000003977	IV	rs727503258

Генетические варианты c.709C>T (p.R237W), c.728G>A (p.R243H) и c.2347C>T (p.R783C) локализованы в регионе гена *MYH7* между кодонами 181 и 937, который составляет большую часть головного домена миозина. Было показано, что миссенс-варианты в этой области значительно преобладают у пациентов с ГКМП [187]. Кроме того, этот регион обоснован как отдельный критерий для интерпретации генетических вариантов в гене *MYH7* в рекомендациях Kelly et al., 2018 [177].

В генах *PLN*, *DES*, *TMEM43*, *TGFB3*, *CTNNA3*, *LDB3*, *CRYAB*, *FLNC*, *TTN* патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов обнаружено не было, что позволяет также считать эти генетические формы АКПЖ достаточно редкими в группе российских больных.

3.1.3 Спектр выявленных генетических вариантов неустановленного значения в десмосомных и не-десмосомных генах

В исследованных генах было обнаружено 26 генетических вариантов неустановленного значения у 24 пробандов (Таблица 16). Идентичных генетических вариантов, встречающихся более чем в одной семье, обнаружено не было. Среди генетических вариантов 13 (50,0%) были обнаружены в десмосомных генах.

Большинство вариантов (N=23 (88,5%)) представляли собой миссенс-варианты, связанные с заменой одной аминокислоты на другую, 2 генетических варианта были связаны с изменениями сайтов сплайсинга, 1 – с делецией без сдвига рамки считывания.

Вариант неустановленного значения p.A185T в гене *SCN5A* был обнаружен у пациентки с достоверным диагнозом АКПЖ и выявленным вариантом неустановленного значения c.6209-3C>G в гене *FLNC*.

Выявленные генетические варианты в десмосомных и не-десмосомных генах и, при наличии, ссылка на информацию в базах данных представлены в таблице 16. В нашей выборке больных в генах *DSC2*, *JUP*, *TTN*, *CRYAB*, *LDB3* и *FLNC* были обнаружены исключительно варианты неустановленного значения, патогенность которых пока не является доказанной.

В генах *PLN*, *DES*, *TMEM43*, *TGFB3*, *CTNNA3* вариантов с неустановленным клиническим значением обнаружено не было.

Таблица 16. Локализация в гене и информация в базах данных для генетических вариантов III класса патогенности в исследованных генах у пациентов с АКПЖ.

№	Ген	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Число пробандов	Ссылки
1	<i>PKP2</i>	c.1576A>G	p.T526A	0.0001202	III	1	rs397516999
2	<i>PKP2</i>	c.1745T>C	p.L582P	н/д	III	1	новая
3	<i>DSG2</i>	c.733A>C	p.N245H	0.00003183	III	1	rs1413973212
4	<i>DSP</i>	c.273+5G>A		0.00028	III	1	rs200473206
5	<i>DSP</i>	c.1349C>T	p.P450L	0.00001769	III	1	rs756357907
6	<i>DSP</i>	c.2622C>G	p.I874M	0.00004248	III	1	rs751067479
7	<i>DSP</i>	c.3600T>G	p.N1200K	0.00007083	III	1	rs202049575
8	<i>DSP</i>	c.4018C>T	p.R1340C	0.00004389	III	1	rs768628788
9	<i>DSP</i>	c.7856T>C	p.I2619T	н/д	III	1	новая

10	<i>DSC2</i>	c.601G>A	p.V201I	0.00001193	III	1	rs202058544
11	<i>DSC2</i>	c.1436G>A	p.R479H	0.000007077	III	1	rs774641579
12	<i>JUP</i>	c.884_886del	p.Leu295_Ala296delinsPro	н/д	III	1	новая
13	<i>JUP</i>	c.1916A>G	p.E639G	н/д	III	1	новая
14	<i>LMNA</i>	c.448A>G	p.T150A	н/д	III	1	rs58917027
15	<i>LMNA</i>	c.977C>T	p.S326L	0.00001600	III	1	rs745540806
16	<i>SCN5A</i>	c.553G>A	p.A185T	0.0004166	III	1	rs192113333
17	<i>SCN5A</i>	c.1162A>T	p.I388F	н/д	III	1	новая
18	<i>SCN5A</i>	c.4467G>C	p.E1489D	н/д	III	1	новая
19	<i>TTN</i>	c.86160A>T	p.E28720D	н/д	III	1	новая
20	<i>LDB3</i>	c.160G>A	p.G54S	0.00003182	III	1	rs201786090
21	<i>LDB3</i>	c.715G>A	p.V239I	0.0001379	III	1	rs201417512
22	<i>LDB3</i>	c.1051A>G	p.T351A	0.0004345	III	1	rs138251566
23	<i>CRYAB</i>	c.116C>T	p.P39L	0.0002826	III	1	rs149787233

24	<i>FLNC</i>	c.3938G>T	p.R1313 L	0.000004014	III	1	rs199804244
25	<i>FLNC</i>	c.6209- 3C>G		0.00004675	III	1	rs896971028
26	<i>FLNC</i>	c.6278A>C	p.D2093 A	н/д	III	1	новая

При интерпретации данных генетических вариантов в подавляющем большинстве случаев выполнялись критерии PM2 (частота аллеля не должна превышать 0,01% для аутосомно-доминантных заболеваний) и PP3 (результаты не менее трёх программ предсказания патогенности *in silico* подтверждают патогенное действие варианта на ген или продукт гена) [116, 126]. Суммы критериев было достаточно только для «статуса» генетического варианта III класса патогенности.

Для повышения класса патогенности не хватает результатов дополнительных исследований: описаний клинических случаев пациентов с АКПЖ в научной литературе, сегрегационного анализа, функционального анализа, описаний «горячих» точек и/или важных и хорошо исследованных функциональных доменов белков.

Однако, с появлением новых данных выявленные генетические варианты III класса патогенности могут поменять «статус» после проведения ре-интерпретации.

3.1.4. Доля выявленных вариантов III-V классов патогенности в исследованных генах

В нашей выборке больных с АКПЖ были обнаружены 22 патогенных и вероятно патогенных генетических варианта как в десмосомных (*PKP2*, *DSG2*, *DSP*), так и в недесмосомных генах (*MYH7*, *MYBPC3*, *SCN5A*, *LMNA*). Доля выявленных вариантов IV-V класса патогенности в исследованных генах у пробандов с АКПЖ приведена на Рис. 11.

В нашей группе больных 15 мутаций (68,2%) были обнаружены в генах *PKP2*, *DSG2* и *DSP*. Типы АКПЖ, обусловленные мутациями в этих генах, относят к наиболее частым во всех этнических группах, кроме жителей острова Наксос (Греция) [27]. Большая часть мутаций была выявлена в десмосомных генах *PKP2* и *DSP* (N=11, 50%). Число мутаций в гене *DSP* преобладало над мутациями в гене *PKP2*, что отличает нашу выборку больных от европейских выборок. Можно предположить, что десмосомные мутации вызывают чаще выраженный

фенотип АКПЖ, в то время как мутации в других генах приводят к спектру заболеваний, включая другие типы кардиомиопатий и фенокопий АКПЖ [42, 150].

Варианты, приводящие к прекращению синтеза белка (нонсенс-мутации, мутации со сдвигом открытой рамки считывания, изменения канонических нуклеотидов сайта сплайсинга) составили 63,6% от числа всех обнаруженных генетических вариантов IV-V классов патогенности, что соответствует результатам исследований других групп авторов [41, 50].

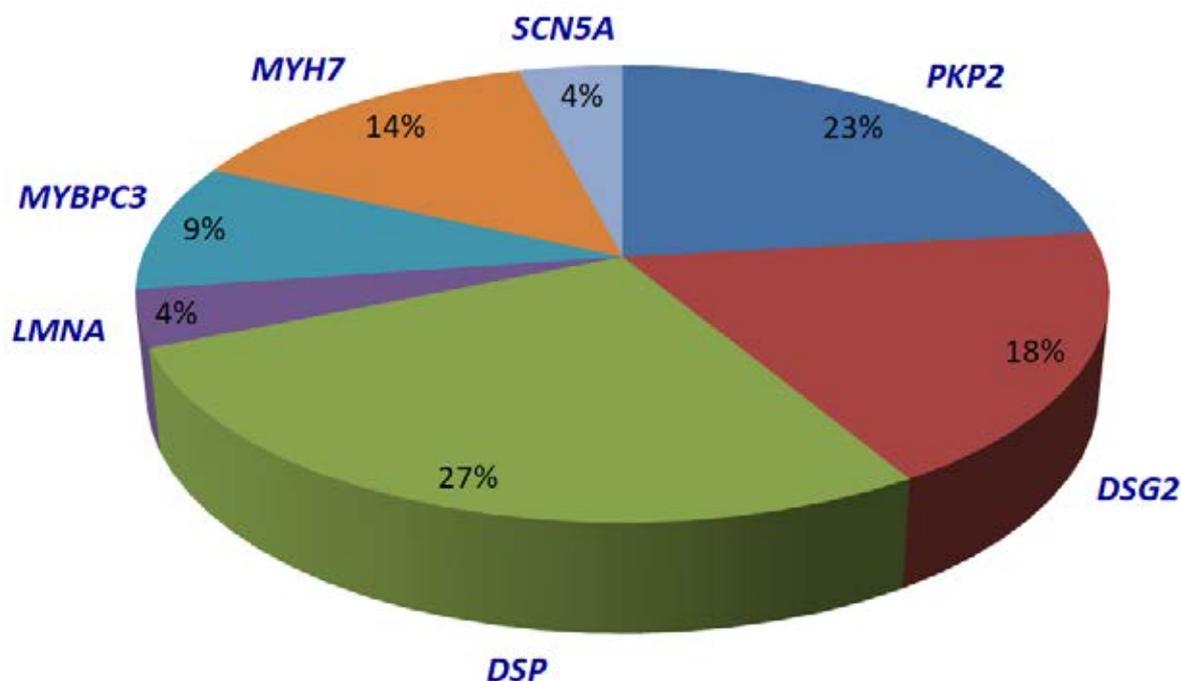


Рисунок 11. Доля выявленных вариантов IV-V класса патогенности в исследованных генах у пробандов с АКПЖ.

В нашей выборке больных с АКПЖ также были обнаружены 26 вариантов неустоановленного значения как в десмосомных (*PKP2*, *DSG2*, *DSP*, *DSC2*, *JUP*), так и в недесмосомных генах (*SCN5A*, *LMNA*, *TTN*, *CRYAB*, *LDB3*, *FLNC*). Доля выявленных вариантов III класса патогенности в исследованных генах у пробандов с АКПЖ приведена на Рис. 12.

Соотношение «мутация:VUS» в нашей группе больных составило 0,85:1.

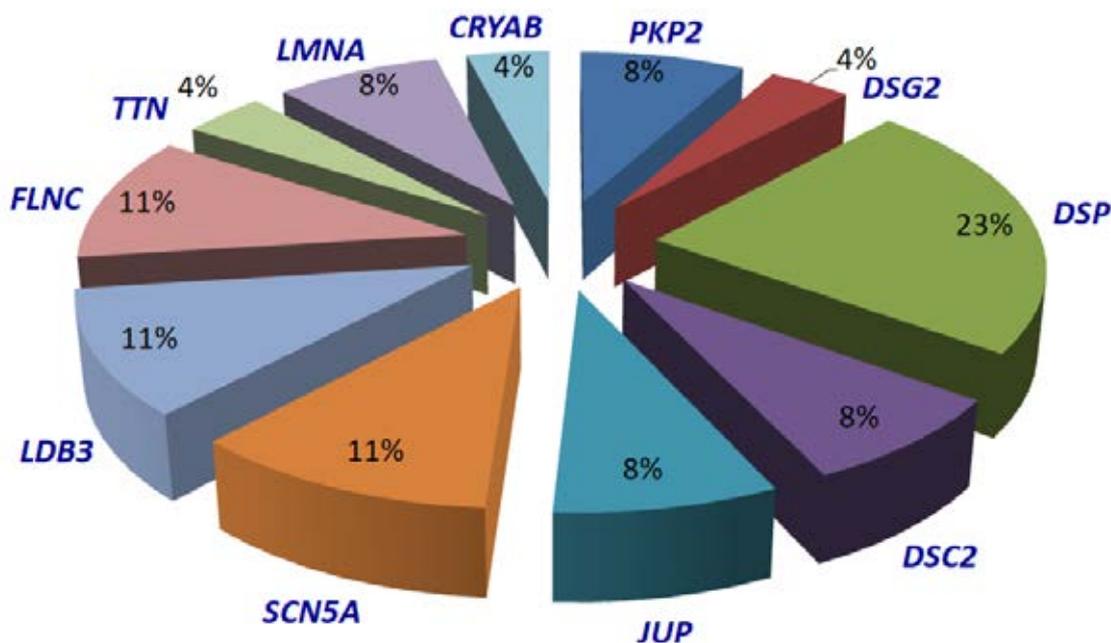


Рисунок 12. Доля выявленных вариантов III класса патогенности в исследованных генах у пробандов с АКПЖ.

3.2. Эффективность проведенной ДНК-диагностики пациентов с АКПЖ

Эффективность проведенной ДНК-диагностики мы оценивали по следующим показателям:

- 1) Общему показателю диагностического выхода проведенной ДНК-диагностике при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности в общей выборке пациентов с АКПЖ;
- 2) Доле пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами в общей выборке АКПЖ;
- 3) Диагностическому выходу и доле пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения отдельно в подгруппах больных с достоверным, вероятным или возможным диагнозами АКПЖ;
- 4) Вкладу генетических данных в диагностику заболевания;
- 5) Спектрам выявленных генетических вариантов III-V классов патогенности в выборке АКПЖ в сравнении с группой пациентов с ДКМП;
- 6) Случаям выявления «выпадения» аллеля в генах АКПЖ, снижающего точность ДНК-диагностики заболевания.

3.2.1. Диагностический выход проведенной ДНК-диагностики

Диагностический выход проведенной ДНК-диагностики при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности в нашей выборке пациентов с АКПЖ составил 50%, что соответствует данным зарубежных исследований [125, 198–200]. Таким образом, патогенные, вероятно патогенные генетические варианты, а также варианты неустановленного значения были обнаружены у половины обследованных пробандов.

Однако, диагностически значимыми для подтверждения диагноза АКПЖ и добавления 1 большого диагностического критерия были признаны только патогенные/вероятно патогенные генетические варианты, выявленные у 21 (26,25%) пробанда из выборки.

У 15 пробандов выборки (18,75%) были выявлены патогенные, вероятно патогенные генетические варианты в десмосомных генах. Такие варианты преобладали в исследуемой группе больных. Однако, у 6 пробандов выборки (7,5%) были выявлены патогенные, вероятно патогенные генетические варианты в не-десмосомных генах.

Варианты неустановленного значения были обнаружены у пациентов как в десмосомных (у 9 пробандов (11,25%)), так и в не-десмосомных генах (у 10 пробандов (12,5%)).

Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения в выборке АКПЖ отмечена на рис. 13.

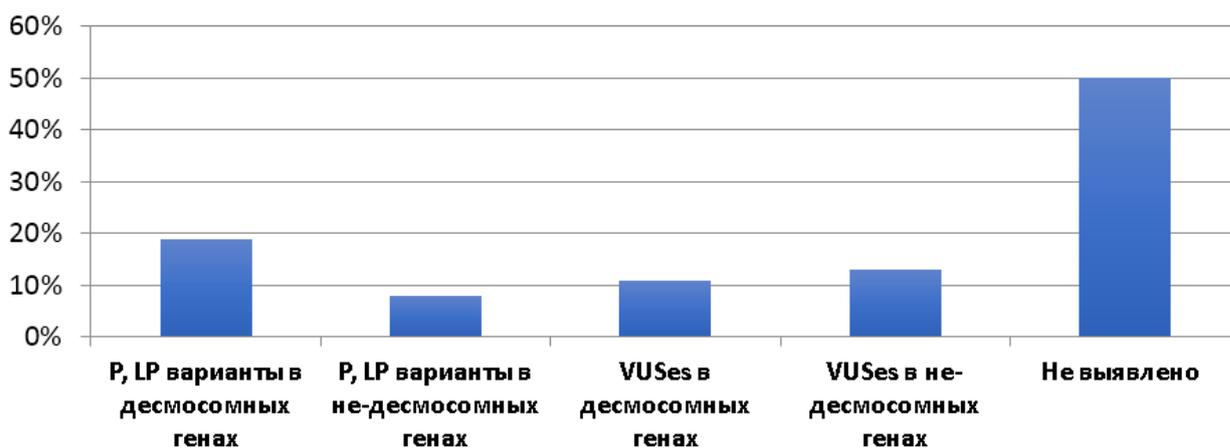


Рисунок 13. Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения в выборке пациентов с АКПЖ.

P – патогенные генетические варианты; LP – вероятно патогенные генетические варианты; VUSes – генетические варианты с неустановленным значением.

Также мы проанализировали показатель диагностического выхода при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности и долю пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения отдельно в подгруппах больных с достоверным (Рис. 14), вероятным (Рис. 15) или возможным (Рис. 16) диагнозами АКПЖ, поставленным до проведения ДНК-диагностики.

Отмечен более высокий показатель диагностического выхода при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности для пациентов групп с достоверным и возможным диагнозами (55,6% и 60% соответственно) по сравнению с показателем для общей выборки. Для пациентов группы с вероятным диагнозом показатель диагностического выхода составил 33,3%, что значительно ниже показателя для общей выборки (50%).

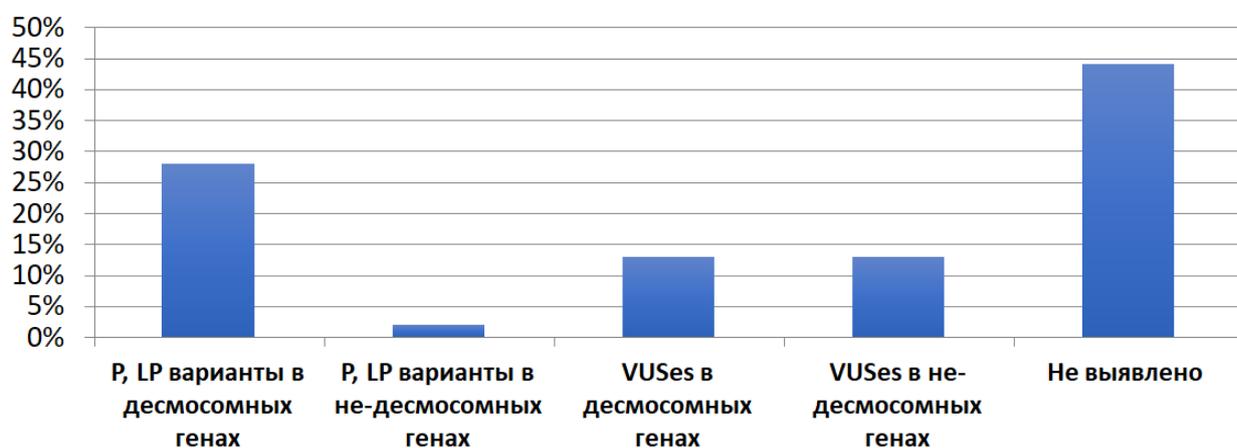


Рисунок 14. Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения у пробандов с достоверным диагнозом АКПЖ.

P – патогенные генетические варианты; LP – вероятно патогенные генетические варианты; VUSes – генетические варианты с неустановленным значением.

Патогенные, вероятно патогенные генетические варианты в десмосомных генах преобладали в группе пробандов с достоверным диагнозом АКПЖ (13 пробандов (28,3%)) и не были обнаружены в группе с возможным диагнозом (0%).

На наш взгляд, это является косвенным подтверждением того, что многие варианты, квалифицированные как VUS, имеют патогенетическое значение, однако недостаточная изученность молекулярного патогенеза не позволяет корректно использовать эти данные в диагностических целях.

Отмечено, что в группе пациентов с вероятным диагнозом АКПЖ число пробандов с патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами и вариантами с

неустановленным значением и в десмосомных, и в не-десмосомных генах было равным (по 16,6%).

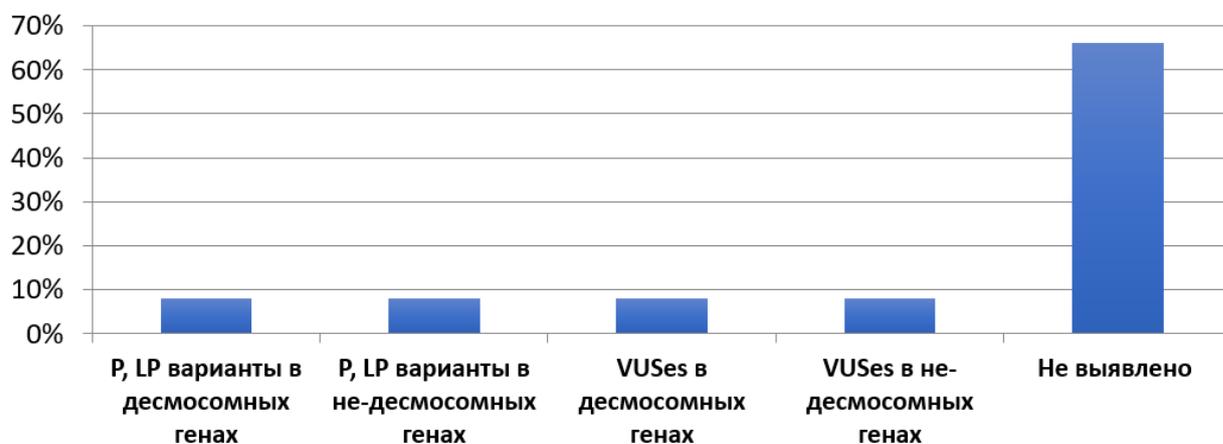


Рисунок 15. Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения у пробандов с вероятным диагнозом АКПЖ.

P – патогенные генетические варианты; LP – вероятно патогенные генетические варианты; VUSes – генетические варианты с неустановленным значением.

Патогенные, вероятно патогенные генетические варианты в не-десмосомных генах преобладали в группе пробандов с возможным диагнозом и признаками других типов кардиомиопатий (3 пробанда (30%)). Доля вариантов неустановленного значения в не-десмосомных генах в этой группе больных (20%) также была выше, чем в десмосомных генах (10%).

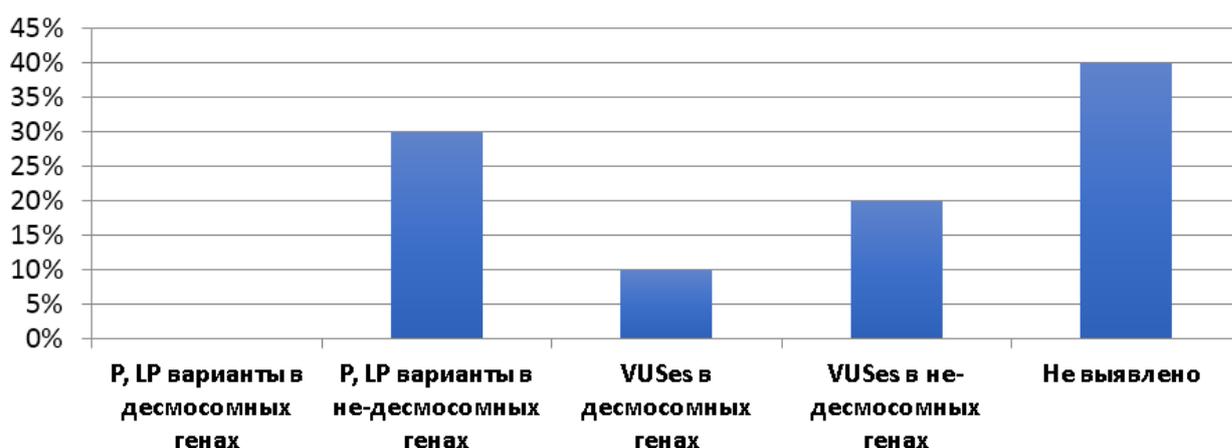


Рисунок 16. Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения у пробандов с возможным диагнозом АКПЖ.

P – патогенные генетические варианты; LP – вероятно патогенные генетические варианты; VUSes – генетические варианты с неустановленным значением.

Диагностически значимые (IV-V классы патогенности) генетические варианты преобладали в подгруппе больных с достоверным диагнозом АКПЖ (14 пробандов (30,5% в подгруппе)), в сравнении с подгруппами больных с вероятным (4 пробанда (16,6% в подгруппе)) и возможным (3 пробанда (30,0% в подгруппе)) диагнозами.

3.2.2. Вклад генетических данных в диагностику заболевания

Наличие пробанда с уже выявленной мутацией, исходя из руководства 2011 г. по генетическому тестированию больных с каналопатиями и кардиомиопатиями является показанием для проведения ДНК-диагностики кровным родственникам пробанда (класс I рекомендаций) [107].

У части пациентов из нашей выборки наблюдалась полная клиническая картина заболевания, что позволяло поставить диагноз без результатов ДНК-диагностики. Однако, такая развернутая картина АКПЖ наблюдается не всегда, особенно на ранних этапах развития заболевания.

Для 7 (8,75%) пробандов из нашей выборки с исходно вероятным или возможным диагнозами после выявления патогенных/вероятно патогенных генетических вариантов (добавления 1 большого диагностического критерия) диагноз АКПЖ был подтвержден и достиг достоверного.

У сына пробанда ARVD25 II-1 (пробанда с выявленной делецией в гене *PKP2*), делеции выявлено не было, поэтому диагноз АКПЖ у сына пробанда был исключен, что может избавить семью от финансовых затрат на регулярное медицинское обследование сына пробанда.

Вклад в диагностику АКПЖ у части пробандов и их родственников после получения результатов ДНК-диагностики отражен в таблице 17.

Таблица 17. Вклад генетических данных в диагностику АКПЖ.

Пациент	Пол/ Возраст	Вероятность диагноза до проведения ДНК- диагностики	Мутация (ген) (+ 1 большой диагностический критерий)	Вероятность диагноза после проведения ДНК- диагностики
ARVD4	М/71 л.	Достоверный	p.W538* (<i>PKP2</i>)	Достоверный
ARVD25 II- 1	М/34 л.	Достоверный	c.1523_1538del (<i>PKP2</i>)	Достоверный

ARVD25 III-1 (сын)	М/10 мес.	Возможный	Мутации, выявленной у отца, нет	Исключен
NRF13	М/26 л.	Достоверный	p.S194L/p.S194L (<i>DSG2</i>)	Достоверный
ARVD23	М/19 л.	Достоверный	p.R49H (<i>DSG2</i>)	Достоверный
ARVD58	Ж/35 л.	Вероятный	p.R243H (<i>MYH7</i>)	Достоверный
ARVD27	Ж/26 л.	Возможный	p.R222Q (<i>SCN5A</i>)	Достоверный

В ряде европейских стран, например, в Швеции, роль каскадного семейного скрининга и выявление генотип-негативных родственников, которым не нужна программа динамического наблюдения, рассматривается как приоритетная цель, более значимая для системы здравоохранения, чем собственно подтверждение диагноза у пробанда [201].

3.2.3. Сравнение спектров генетических вариантов в группах больных с АКПЖ и ДКМП

В рамках нашего исследования мы анализировали спектр генетических вариантов больных с АКПЖ, в сравнении со спектрами генетических вариантов больных с другими типами кардиомиопатий. В качестве группы для сравнения спектров, определения их сходств и различий, была выбрана группа, состоящая из 50 пробандов с ДКМП.

Всем 50 пробандам с ДКМП было проведено секвенирование таргетной панели генов АКПЖ с последующим подтверждением по Сенгеру выявленных генетических вариантов. Изучен спектр выявленных генетических вариантов III-V классов патогенности.

Выявленные патогенные, вероятно патогенные генетические варианты, а также варианты неустановленного значения в группе пробандов с ДКМП в десмосомных и не-десмосомных генах представлены в таблицах 18, 19, на рис. 17.

Таблица 18. Локализация в генах и информация в базах данных для генетических вариантов III-V классов патогенности в десмосомных генах у пациентов с ДКМП.

Ген	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (бд gnomAD)	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
<i>PKP2</i>	c.184C>A	p.Q62K	0.0001680	III	rs199601548
<i>DSG2</i>	c.1481A>T	p.D494A	0.00002807	III	rs19329842

					8
<i>DSP</i>	c.6456delG	p.Leu2153*	н/д	IV	новая
<i>DSC2</i>	c.1729A>G	p.I577V	0.0002655	III	rs201845641
<i>DSC2</i>	c.2587G>A	p.G863R	0.0002619	III	rs147109895
<i>JUP</i>	c.526C>T	p.R176W	0.00005835	III	rs368336007

Таблица 19. Локализация в генах и информация в базах данных для генетических вариантов III-V классов патогенности в не-десмосомных генах у пациентов с ДКМП.

Ген	Нуклеотидная замена	Изменение белка	Частота (б/д gnomAD)	Число пробандов	Присвоенный класс патогенности	Ссылки
<i>LMNA</i>	c.3G>A	p.M1I	н/д	1	V	rs794728598
<i>LMNA</i>	c.59C>A	p.P20Q	н/д	1	III	новая
<i>LMNA</i>	c.347T>G	p.L116R	н/д	1	III	новая
<i>LMNA</i>	c.448A>G	p.T150A	н/д	1	III	rs58917027
<i>LMNA</i>	c.1116G>C	de novo p.E372D	н/д	1	IV	новая
<i>LMNA</i>	c.1129C>T	p.R377C	н/д	1	IV	rs397517889
<i>LMNA</i>	c.1930C>T	p.R644C	0.001193	1	III	rs142000963
<i>DES</i>	c.112delG + c.1353C>G/ del DES	del DES	н/д	1	V	новая
<i>DES</i>	c.665G>A	p.R222H	0.0003995	1	III	rs367961979
<i>DES</i>	c.1009G>C	p.A337P	0.00006792	1	IV	rs59962885
<i>DES</i>	c.1228G>A	de novo p.E410K	н/д	1	IV	новая
<i>TGFB3</i>	c.412T>G	p.S138A	0.0001202	1	III	rs201453600
<i>CTNNA3</i>	c.1382A>G	p.N461S	0.000008017	1	III	rs751206907
<i>CTNNA3</i>	c.1469T>G	p.I490R	0.00002406	1	III	rs764978430

<i>FLNC</i>	c.2635C>T	p.R879C	0.0001407	2	III	rs374983276
<i>FLNC</i>	c.3958G>A	p.E1320K	0.00001786	1	III	rs746217788
<i>FLNC</i>	c.4831A>T	p.T1611S	0.00001210	1	III	rs770231264

В группе пациентов с ДКМП не было обнаружено генетических вариантов III-V классов патогенности в генах *TMEM43*, *PLN*, *LDB3*, *SCN5A*, *CRYAB*, *EMD*.

Диагностический выход при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности составил в группе пациентов с ДКМП 46%, что примерно соответствует показателю диагностического выхода при выявлении генетических вариантов III-V классов патогенности в выборке пациентов с АКПЖ.

Однако, по спектру генетических вариантов III-V классов патогенности 2 исследованные группы различались: отмечено преобладание таких вариантов в не-десмосомных генах *LMNA*, *DES*, *CTNNA3*, *FLNC* у пациентов с ДКМП. В частности, в гене *LMNA* в выборке пациентов с ДКМП выявлено 3 мутации и 4 варианта неустановленного значения, в выборке пациентов с АКПЖ - 1 мутация и 2 варианта неустановленного значения.

Вероятно патогенный генетический вариант в десмосомном гене *DSP* был обнаружен у 1 пациента из выборки ДКМП. Также у пациентов с ДКМП были обнаружены 5 вариантов неустановленного значения в десмосомных генах. Соответствие диагноза пациентов-носителей потенциально патогенных генетических вариантов критериям Маркуса предстоит проанализировать.

Нами было показано «перекрывание» спектров генетических вариантов при разных типах кардиомиопатий, описанное в работах [70, 202–205]. Отмечено преобладание генетических вариантов III-V классов патогенности в десмосомных генах у пробандов с АКПЖ (30%) по сравнению с группой ДКМП (12%). Доля пробандов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами, а также вариантами неустановленного значения в двух исследованных выборках представлена на рис. 17.

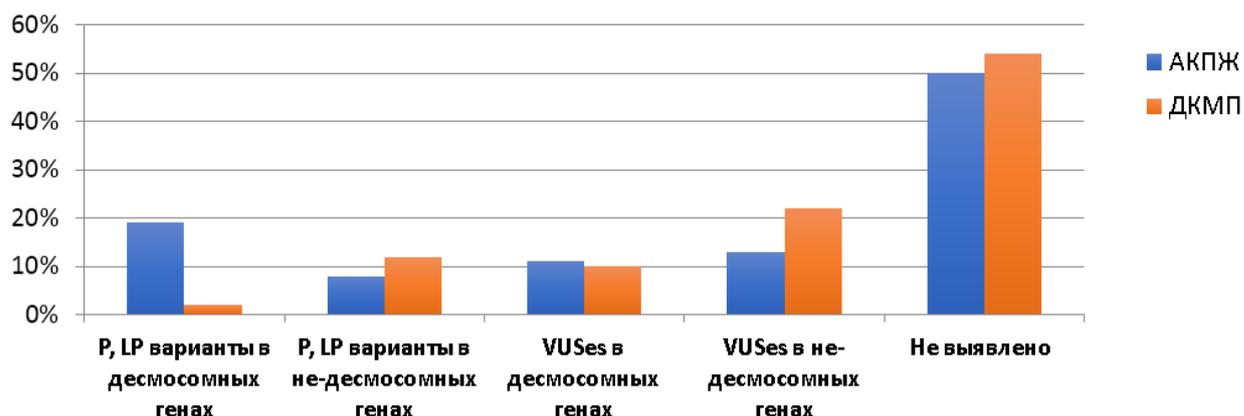


Рисунок 17. Генетические варианты III-V классов патогенности в группах больных с АКПЖ и ДКМП.

P – патогенные генетические варианты; LP – вероятно патогенные генетические варианты; VUSes – генетические варианты с неустановленным значением.

3.2.4. Выявление случаев «выпадения» аллеля в генах АКПЖ

Поиск генетических вариантов в целевой панели генов I «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки» был проведен для 120 пробандов с диагнозами «Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка» и «Дилатационная кардиомиопатия», в целевой панели генов II «Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки» - для 16 пробандов. Каждый образец ДНК из 120 образцов ДНК пациентов был проанализирован на не менее чем одну целевую панель генов. Для части пациентов был ранее проведен независимый скрининг кодирующих и прилежащих интронных областей генов с альтернативной парой праймеров методами NGS и/или прямого секвенирования по Сенгеру.

Мы обнаружили 4 случая ADO как в результатах секвенирования NGS на платформе IonTorrent (2 случая), так и на хроматограммах прямого секвенирования по Сенгеру (2 случая).

В целевых панелях генов ADO приводило к недопредставленности/потери «маркерного» генетического варианта на ридхх секвенирования нового поколения (Таблица 20).

В хроматограммах прямого секвенирования по Сенгеру ADO было связано с «выпадением» одного аллеля, выявленного из-за потери гетерозиготности ранее обнаруженного («маркерного») SNV (single nucleotide variation) в целевом фрагменте ДНК (Таблица 20). Контрольное прямое секвенирование по Сенгеру с альтернативной парой праймеров подтвердило истинный аллельный статус исследуемых ампликонов.

Для определения причины возникновения ADO нами были проанализированы последовательности прямого (F) и обратного (R) праймеров. Причина возникновения ADO

была выявлена во всех 4 случаях (Таблица 20). Все случаи ADO были вызваны однонуклеотидными генетическими вариантами в местах отжига олигопримеров:

- в таргетных панелей генов ADO был вызван редкими или даже уникальными генетическими вариантами (Таблица 20);

- в результатах прямого секвенирования по Сенгеру выявленные случаи ADO были обусловлены частыми SNVs (Таблица 20).

Мы обнаружили, что следствием ADO может служить не только потеря одного аллеля, но и малая представленность «маркерного» варианта на ридовых последовательностях после получения результатов проведения NGS. Например, генетический вариант p.K251R (c.752A>G) в гене *LDB3* у пробанда NRF76 детектируется только в 1 из 2 перекрывающихся ампликонов, и представлен на 1/9 (11%) всех ридов. Мы подтвердили наличие варианта p.K251R в экзоне 7 гена *LDB3* в гетерозиготном состоянии у пробанда NRF76, проведя контрольное секвенирование по Сенгеру с альтернативной пары праймеров (Рисунок 18).

Мы обнаружили, что ADO - это не всегда идентичный процесс даже в одном и том же образце ДНК. Например, три последовательных результата прямого секвенирования образца 16 экзона гена *DSP* у пациента ARVD16 имели один положительный результат (обнаружен гетерозиготный вариант c.2091A>G) и два отрицательных результата (полная потеря варианта c.2091A>G). Потеря одного аллеля была вызвана интронным вариантом c.1904-49T>A, расположенным на 3'-конце праймер-связывающего сайта (Рис. 19).

Кроме того, амплификация только одного аллеля приводила к снижению диагностического выхода проведенной ДНК-диагностики, причиной которого послужил ADO. Данный вывод был нами сделан при сравнении результатов двух таргетных панелей с перекрывающимися спектрами генов и различными олигопраймерами, охватывающими целевые области гена *LDB3*. Пациентке ARVD19 с комбинированным фенотипом сочетания двух типов кардиомиопатий (КМП) были последовательно отсеквенированы 2 таргетные панели генов; вариант неустановленного значения c.1051A>G (p.T351A) в гене *LDB3* в образце ARVD19 был обнаружен только на панели I («Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки») (Рисунок 20А), но не на панели II («Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки») (Рисунок 20Б). Гетерозиготное состояние генетического варианта c.1051A>G (p.T351A) в гене *LDB3* было подтверждено контрольным секвенированием по Сенгеру (Рисунок 20В). Причиной того, что вариант первоначально не был детектирован в панели II, послужил ADO (Таблица 20).

Также нами было обнаружено, что ADO может возникать не только в случае локализации SNV в 3' области праймер-связывающего сайта, но и ближе к его 5' концу.

Генетический вариант с.2300-195A>G в 11 интроне гена *PKP2*, находясь в области праймера ближе к 5' концу, приводил к амплификации только 1 аллеля во всех (N=9) исследованных нами ампликонах (Таблица 21).

Для исключения амплификации только одного аллеля (гемизиготное состояние) все ампликоны с выявленными случаями ADO, были ре-секвенированы с помощью альтернативной пары праймеров. Факт избирательной амплификации аллелей был подтвержден во всех представленных случаях (Таблица 20, Рис. 21).

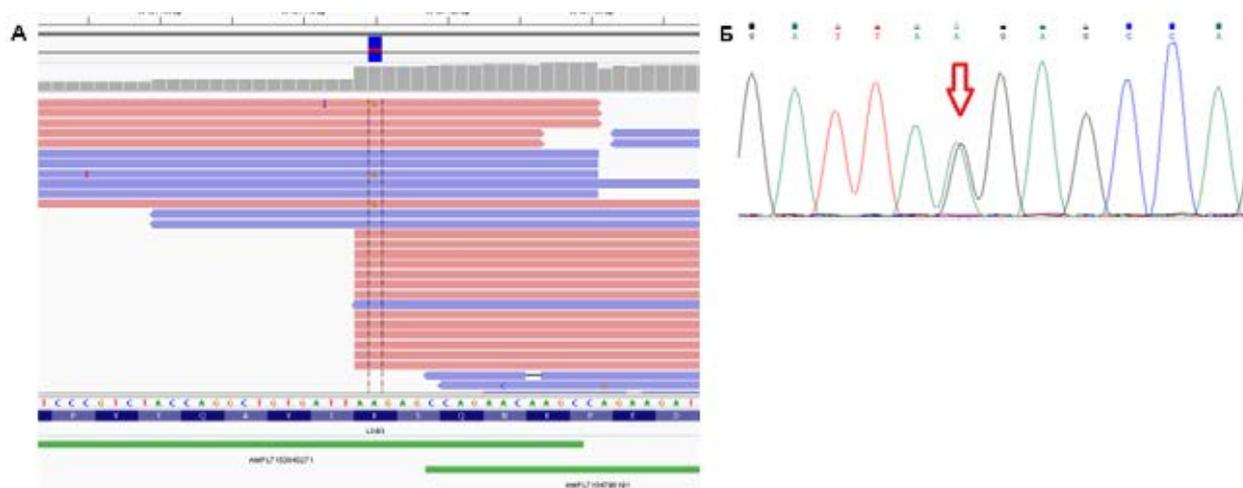


Рисунок 18. Явление «выпадения» аллеля в экзоне 7 гена *LDB3* у пробанда NRF76.

А. Результаты секвенирования панели генов АКПЖ, генетический вариант p.K251R детектируется только в 1 из 2 ампликонов; **Б.** Результаты контрольного секвенирования по Сенгеру экзона 7 гена *LDB3* у пробанда NRF76. Подтверждено наличие варианта p.K251R в гетерозиготном состоянии.

Таблица 20. Выявленные случаи ADO в результатах секвенирования.

Ген	Геномная координата ампликона (hg19)	Причина ADO	MAF*	Маркерный вариант (-ы)	Зиготность	Тип «выпадения» аллеля	Платформа секвенирования случаями ADO	Платформа для ре-секвенирования	Число подтвержденных случаев ADO
<i>PKP2</i>	chr12:32948847-32949434	c.2300-195A>G	0.139	c.2489+13_2489+14insC, c.2489+72_73delinsA*, c.2489+109A>G	Гетерозигота	Отсутствие аллеля WT (*детекция в гомозиготном состоянии)	Прямое секвенирование по Сенгеру	Ion Torrent	9
<i>DSP</i>	chr6:7572015-7572438	c.1904-49T>A	0.411	c.2091A>G (p.G697G)	Гетерозигота	Отсутствие	Прямое секвенирование по Сенгеру	Ion Torrent	1
<i>LDB3</i>	chr10:88466446-88466568	p.T351A (c.1051A>G)	0.0006	p.T351A (c.1051A>G)	Гетерозигота	Недопредставленность (3%)	Ion Torrent	Ion Torrent, прямое секвенирование по Сенгеру	1
<i>LDB3</i>	chr10:88451719-88451942	p.K251R (c.752A>G)	0.0014	p.K251R (c.752A>G)	Гетерозигота	Недопредставленность (11%)	Ion Torrent	Прямое секвенирование по Сенгеру	1

* MAF в европейской (не-финской) популяции по данным базы данных gnomAD

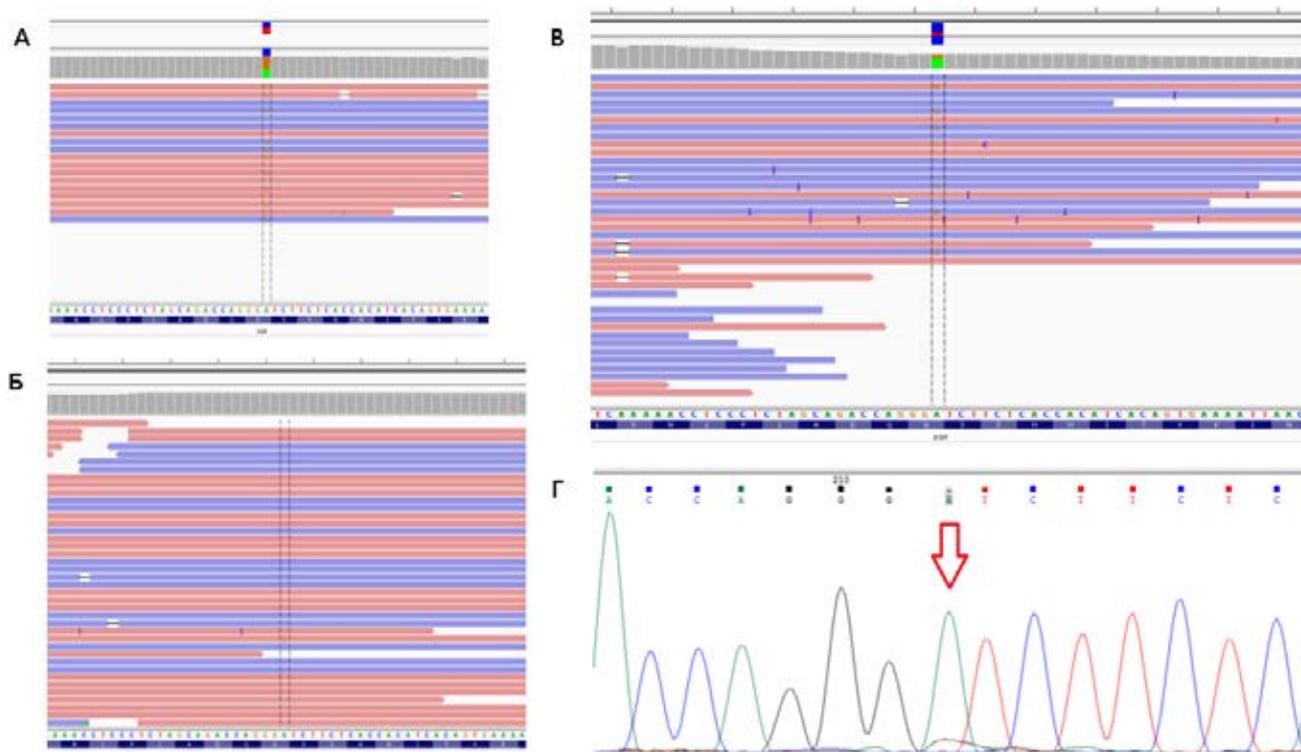


Рисунок 19. Результаты секвенирования NGS на платформе IonTorrent и прямого секвенирования по Сенгеру экзона 15 гена *DSP* у пациента ARVD16: Показано различие в зиготности маркерного полиморфизма с.2091A>G (p.G697G) из-за ADO, случившегося по причине наличия частого полиморфизма с.1904-49T>A в последовательности F праймера.

А. Результаты секвенирования AmpliSeq панели генов «АКПЖ» на платформе Ion Torrent; генетический вариант p.G697G в гетерозиготном состоянии; **Б, В.** Результаты NGS секвенирования ампликоновых библиотек на платформе Ion Torrent в двух независимых запусках с использованием праймеров, альтернативных праймерам AmpliSeq. Генетический вариант p.G697G в гетерозиготном состоянии детектируется только в одном запуске. **Г.** Результаты прямого секвенирования по Сенгеру экзона 15 гена *DSP* с использованием праймеров, альтернативных праймерам AmpliSeq.

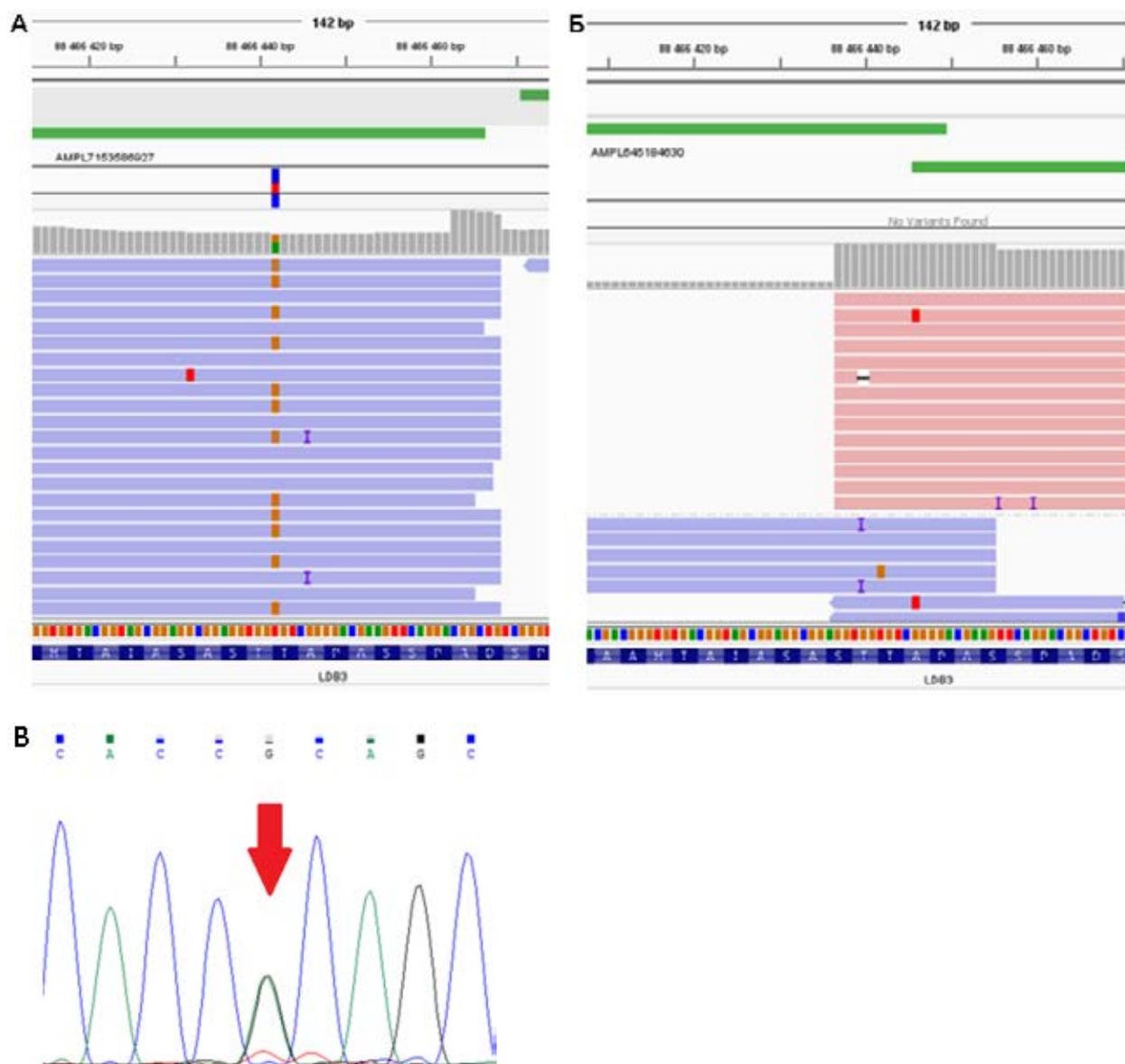


Рисунок 20. Явление «выпадения» аллеля в гене *LDB3* в образце ДНК пробы ARVD19. **А.** Фрагмент результатов секвенирования таргетной панели I на платформе Ion Torrent. **Б.** Фрагмент результатов секвенирования таргетной панели II на платформе Ion Torrent. **В.** Результаты контрольного секвенирования по Сенгеру экзона. Подтверждено наличие варианта с.1051A>G в гетерозиготном состоянии (отмечено стрелкой).

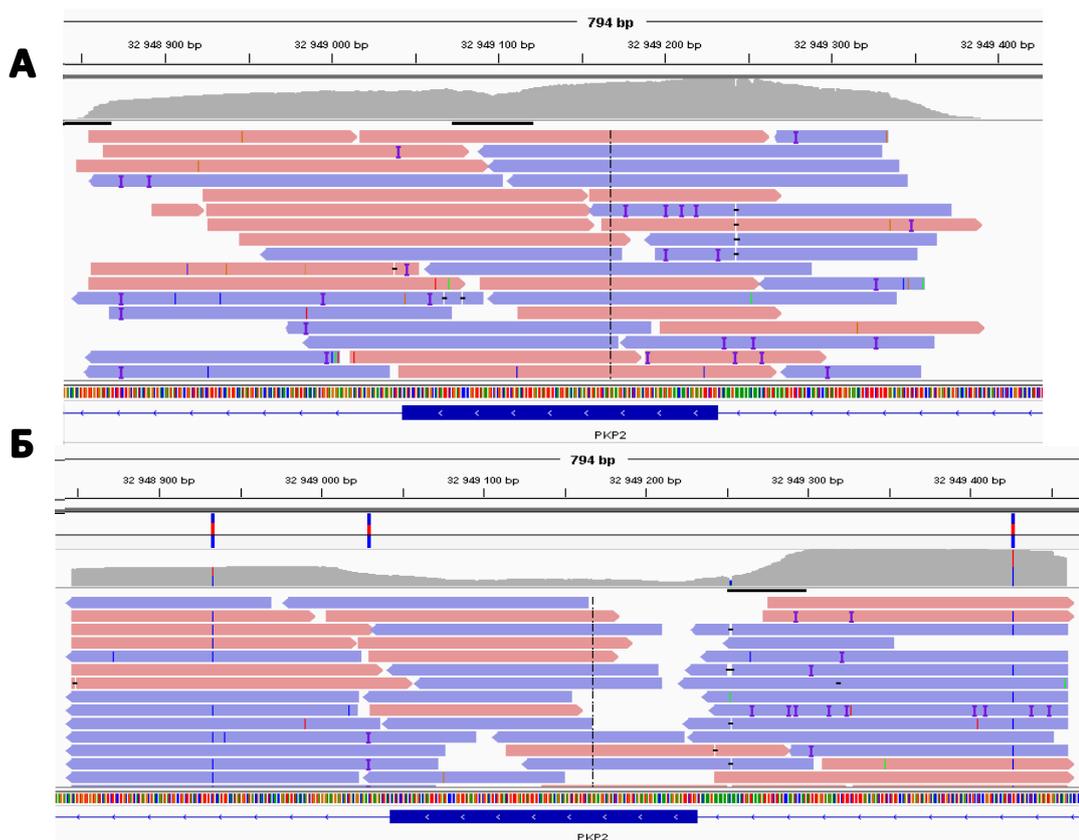


Рисунок 21. Результаты секвенирования (праймеры для прямого секвенирования, прочтение с помощью Ion PGM), наглядно отражающие избирательную амплификацию аллелей в экзоне 12 гена *PKP2* у пациента DCM56.

А. Исходный сиквенс, гемизиготное состояние; **Б.** Результаты ре-секвенирования с альтернативной пары праймеров, подтверждено наличие 3 полиморфизмов в гетерозиготном состоянии.

Все случаи ADO, выявленные в нашем исследовании, обусловлены локус-специфичными причинами при нормальных концентрациях образцов ДНК (Таблица 20).

В результатах NGS мы наблюдали частичную гемизиготность или недопредставленность гетерозиготных генетических вариантов. Мы полагаем, что некоторые из этих «недопредставленных» генетических вариантов на ридх могут быть отфильтрованы автоматически во время обработки данных NGS.

Кроме того, мы повторно проанализировали праймер-связывающие сайты, содержащие SNVs, в ампликонах для прямого секвенирования и в перекрывающихся ампликонах таргетных панелей генов, и обнаружили «недопредставленность» SNVs на ридх NGS либо наличие интересующего SNV только в ридх 1 ампликона из двух (таблица 21). Такие ампликоны были нами включены в группу ампликонов, потенциально связанных с риском ADO (Таблица 21).

Таблица 21. Локализация SNVs в сайтах связывания олигопраймеров как причина потенциального снижения эффективности ПЦР.

Ген	Геномная координата ампликона (hg19)	SNV, потенциально снижающие эффективность ПЦР	AF* (gnomAD)	Регистрационный номер SNV в ClinVar
<i>DSP</i>	chr6:7574805-7575146	с.2298-85C>T	0,605	VCV000672134.1
<i>DSP</i>	chr6:7579369-7580822	с.3085-115C>T	0,676	VCV000672150.1
<i>LDB3</i>	chr10:88466471-88466552	с.1074C>T (р.А358А)	0,044	VCV000036443.3
<i>LDB3</i>	chr10:88493015-88493177	с.*450G>А	0.001556	нет
<i>FLNC</i>	chr7:128480667-128480889	с.1614C>T (р.У538У)	0,039	VCV000129082.2
<i>FLNC</i>	chr7:128487631-128487861	с.4404Т>С (р.Д1468Д)	0,999	VCV000226641.1

* Частота аллеля (AF) в европейской (не-финской) популяции по данным базы данных gnomAD.

В исследовании Jeong et al. было показано, что «недопредставленность» генетических вариантов на ридовых NGS не зависит от глубины прочтения. Была продемонстрирована воспроизводимость феномена ADO в результатах секвенирования в 3-х последовательных запусках Ion S5 с глубиной прочтения от 1985 до 8608 ридов [120].

Известно, что количество используемых диагностических праймеров прямо пропорционально риску возникновения ADO [206]. В нашей таргетной панели генов I «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки» исследуемая область фланкируется 521 парой праймеров (Таблица 5). Та же область фланкируется ~ 250 парами праймеров, подобранных для прямого секвенирования по Сенгеру. Значит, применения технологии NGS напрямую связано с риском возникновения ADO. Учитывая случаи доказанного и потенциально ADO, мы полагаем, что 4 ампликона из 521 ампликона панели могут находиться под риском ADO, что может влиять на эффективность амплификации до 0,77% ампликонов панели. В таргетной панели генов II «Гены, кодирующие саркомные и связанные с ними белки» это значение составило 0,68%.

В отличие от ридов NGS, на хроматограммах прямого секвенирования по Сенгеру мы наблюдали увеличение числа ложных гомозигот.

В нашем исследовании показано, что кросс-валидация генетических результатов, выявленных одной платформой для секвенирования, с помощью альтернативной платформы является эффективной стратегией ДНК-диагностики для снижения количества ложных результатов. Однако, не существует общепринятого метода уменьшения (не говоря уже об эффективном обнаружении) частичной гемизиготности вследствие «выпадения» аллеля. Похоже, что повторное секвенирование интересующей области двумя независимыми парами олигопраймеров остается «золотым стандартом» ДНК-диагностики.

Таким образом, реальная частота феномена ADO остается неизвестной и зависит от количества пар праймеров. Программное обеспечение, которое включает обновления по распределению SNVs для того, чтобы избежать ADO в результате автоматического дизайна олигопраймеров, может повысить точность ДНК-диагностики.

Полученные результаты могут быть применимы для исследования данного феномена при других нозологиях, а также для разработки биоинформатических ресурсов для поиска потенциальных регионов «выпадения» аллеля.

3.3. Гено-фенотипические корреляции в группе больных с АКПЖ

Мы изучили гено-фенотипические корреляции в группе больных с АКПЖ на основе анализа клинического полиморфизма аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка, спектра выявленных генетических вариантов III-V классов патогенности, результатов сегрегационного и статистического анализа.

По результатам проведенного анализа был предложен алгоритм молекулярно-генетической диагностики больных с АКПЖ.

3.3.1. Спектр клинических проявлений аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка

В рамках исследования фенотипа АКПЖ нами были проанализированы доступные клинические данные по пробандам и их родственникам. Характеристика выборки больных представлена в таблице 22.

Таблица 22. Характеристика выборки пациентов.

Параметр	Число (%) пациентов
ВСС/заболевания сердца в семье	24 (30%)
Синкопальные состояния	18 (22,5%)
ХСН	12 (15%)
Эпикардальный жир (МРТ)	33 (41,25%)
Нейро-мышечное заболевание	1 (1,25%)
Диагноз АКПЖ по результатам аутопсии	2 (2,5%)
Показания к имплантации ИКД	30 (37,5%)

Был отмечен возраст появления первых симптомов заболевания: чаще всего с 26 до 40 лет (у 23 пробандов) (Рис. 22).

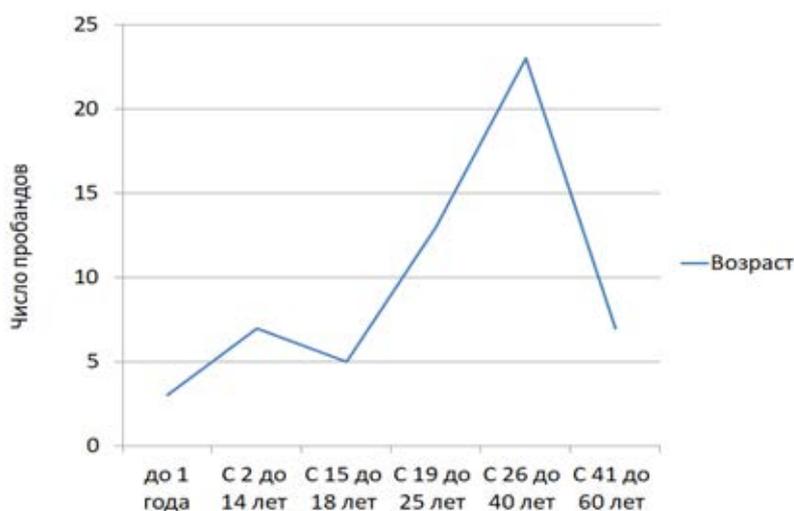


Рисунок 22. Возраст появления первых симптомов заболевания у пробандов с АКПЖ.

Семейный анамнез, явно отягощенный по первичным заболеваниям сердца и/или случаям ВСС, был отмечен в 24 (30%) семьях. У 20 пробандов кардиомиопатии были выявлены у родственников 1 степени родства, в 4 семьях – также у родственников второй и более степеней родства. В двух семьях отмечалась внезапная смерть родственника молодого возраста (до 40 лет).

Кроме того, в двух семьях с отягощенным семейным анамнезом была отмечена смерть родственника в младенчестве (до 1 года) по неизвестной причине: в 1 семье – смерть сестры пробанда (1 степень родства), во 2 семье - смерть сестры отца пробанда (2 степень родства).

По утверждению 21 пробанда, они были единственными больными среди известных родственников, поэтому частоту спорадических случаев АКПЖ у российских больных мы оцениваем не ниже 26%. Однако у детей 3-их пробандов (из 21) были отмечены кардиальные жалобы (у 2 детей на фоне спортивных нагрузок); дети пробандов не были обследованы на момент проведения первичной консультации врача-генетика.

В остальных семьях (35 пробандов, 44%) информации о состоянии здоровья родственников (в том числе, одного из родителей) было недостаточно для заключения о семейном или спорадическом характере заболевания.

Специфические фенотипические признаки были отмечены у 3-х пациентов: в 1 случае – гиперкератоз, в 1 случае - черепно-лицевые аномалии в сочетании с аномалиями развития сосудов, в 1 случае - гипертрихоз, гипоплазия лица, гипертелоризм, Х-образная деформация нижних конечностей.

Эпсилон-волна на ЭКГ (рис. 23) была выявлена у 21 пробандов (26,3%). У 8 больных эпсилон-волна регистрировалась непостоянно.

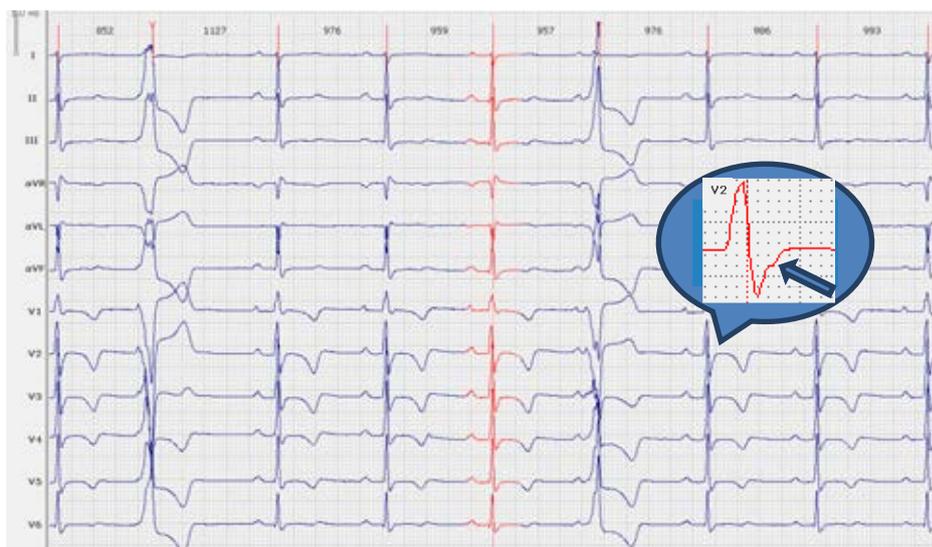


Рисунок 23. Фрагмент разовой ЭКГ с регистрацией ϵ -волны в отведении V_2 , инверсией зубца T в отведениях V_1 - V_3 у пробанда ARVD25 II-1.

Паттерн синдрома Бругада 1 типа («тип бультерьера») был зарегистрирован у 1 пробанда сразу после синкопального эпизода. У 3 пробандов зарегистрированы «седловидные» (2-ого типа) паттерны синдрома Бругада (рис. 24).

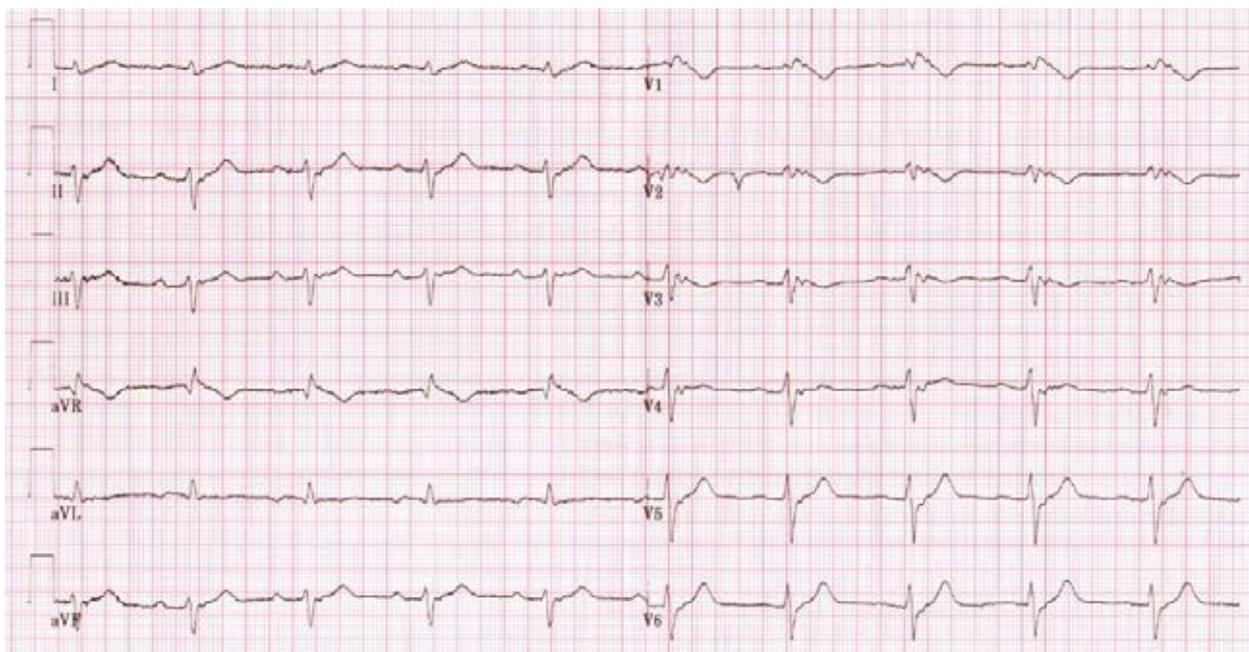


Рисунок 24. Фрагмент разовой ЭКГ пациента ARVD4 сразу после пароксизма стабильной желудочковой тахикардии после внутривенной инфузии лидокаина и амиодарона с последующей кардиоверсией: «седловидный» паттерн синдрома Бругада в отведениях V₁-V₂, ε - волна в отведениях V₁-V₅, II, III и aVF, отрицательные Т-волны в отведениях V₁-V₃ (ЭКГ любезно предоставлена д.м.н., проф. Благовой О.В.)

Бивентрикулярная форма заболевания была отмечена у 11 (13,75%) пробандов. Наряду с АКПЖ у 18 (22,5%) пробандов выборки присутствовала картина синдрома ДКМП. Некомпактный миокард левого желудочка (по критериям [207] выявлен у 9 пробандов. У 6 пробандов выявлена повышенная трабекулярность ЛЖ. Клинические признаки кардиомиопатий в группе больных с АКПЖ представлены на рис.25.

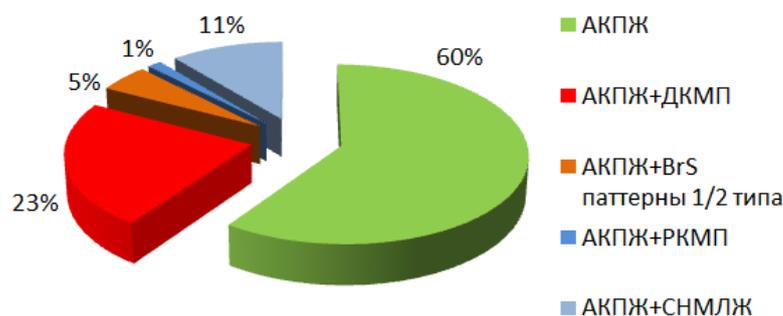


Рисунок 25. Клинические признаки кардиомиопатий в группе больных с АКПЖ.

Признаки миокардита инфекционной или вирусной этиологии у пробандов с АКПЖ были выявлены в 36 (45,0%) случаях.

Участие в спортивных соревнованиях отмечали 10 (12,5%) пробандов, среди них имеют спортивный разряд 4 пробандов: 2 – тяжелая атлетика, 1 – лыжные гонки, 1 – нет информации.

3.3.2. Результаты сегрегационного анализа для пациентов с АКПЖ

В исследуемой выборке у 11 (68,8%) кровных родственников пробандов были выявлены генетические варианты III-V классов патогенности. Особенности клинической картины родственников пробандов представлены в Таблице 23.

Таблица 23. Внутрисемейный полиморфизм клинических проявлений у носителей выявленных генетических вариантов.

Семья	Выявленный генетический вариант	Возраст/пол пробанда	Диагноз АКПЖ До ДНК-диагностики	Родство с пробандом, возраст*	Диагноз АКПЖ До ДНК-диагностики	Особенности клинической картины родственника пробанда
ARVD25	<i>PKP2</i> с.1523_1538 del	34 л./ М	Достоверный	Мать пробанда, 61 г.	Нет информации	КМП?
ARVD36	<i>PKP2</i> с.336+1G>T	25 л./ Ж	Достоверный	Мать пробанда, 66 л.	Нет информации	Брадикардия
ARVD62	<i>DSG2</i> р.С194L/N + <i>DSG2</i> р.С194L/N	29 л./ М	Вероятный	Отец пробанда, 51 г.	Нет информации	Бессимптомный ?
				Мать пробанда, 52 г.	Нет информации	Бессимптомный ?
ARVD46	<i>FLNC</i> р.Р1313L	34 л./ М	Достоверный	Мать пробанда, н/д	Нет информации	Аритмия неуточненная
ARVD27	<i>SCN5A</i> р.Р222Q	26 л., Ж	Возможный	Дочь пробанда, 10 л.	Нет информации	Бессимптомная
ARVD77	<i>SCN5A</i> р.А185Т, <i>FLNC</i> с.6209-3С>G	36 л./ Ж	Достоверный	Отец пробанда, 61 г.	Нет информации	Бессимптомный
				Мать пробанда, 59 л.	Нет информации	Бессимптомный ?
ARVD40	<i>DSG2</i> с.523+1G>A	20 л./ Ж	Вероятный	Отец пробанда,	Достоверный	АКПЖ достоверный

				51 г.		диагноз
ARVD71	SCN5A p.E1489D	66 л./ М	Достовер- ный	Сын пробанда	Нет информации	ВСС в возрасте 23 г. На аутопсии диагностирован а КМП
				Сын пробанда, 24 г.	Нет информации	Эпсилон-волна, КМП?

Примечание: * - указан возраст родственника на момент проведения сегрегационного анализа.

В работе DeWitt et al. 2019 г. представлены случаи обнаружения вариантов пробандов у их родителей, бессимптомных либо имеющие «легкие» симптомы заболевания, отражающую низкую пенетрантность АКПЖ [208]. Авторы работы предполагают, что манифестация АКПЖ у более молодых пробандов может служить доказательством каузативности выявленных потенциально патогенных вариантов [208].

3.3.3. «Частые» мутации у больных с АКПЖ

В нашей выборке были обнаружены 2 мутации в четырех независимых семьях:

1) мутация p.S194L в гомозиготном состоянии в гене *DSG2* была обнаружена в двух семьях кавказского происхождения.

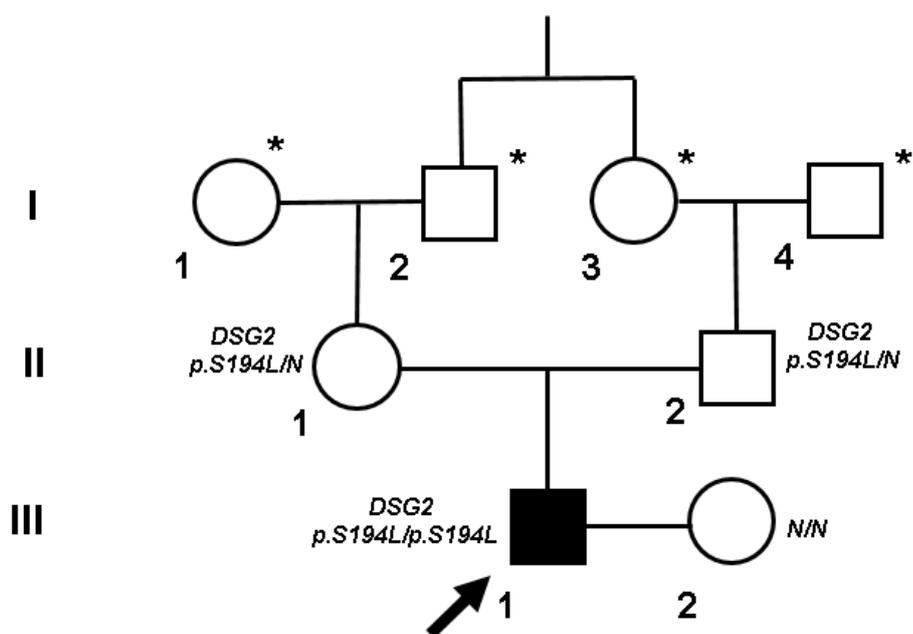
Пробанд NRF13. В 20 лет пробанду было выполнено ушивание дефекта межпредсердной перегородки, через 2 года отмечено снижение резистентности к физическим нагрузкам, нарушение сердечного ритма, одышка, отеки. В возрасте 26 л. проведено медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика.

Согласно критериям Маркуса был выставлен диагноз АКПЖ как «достоверный». Пациент оказался гомозиготным по вероятно патогенному генетическому варианту p.S194L в гене *DSG2*.

Наличие мутации в гомозиготном состоянии может быть результатом «выпадения» аллеля, делеции всего аллеля гена *DSG2*, или общего происхождения (кровное родство родителей). Принадлежность пациента к населению Северного Кавказа (Республика Дагестан), где широко распространены близкородственные браки, даже между двоюродными братьями и

сестрами, может быть доказательством общего происхождения аллелей гена *DSG2*. Каскадный семейный скрининг проведен не был в отсутствие биологического материала родителей пробанда. На основании результатов клинического и генетического обследования был имплантирован двухкамерный ИКД.

В дальнейшем мутация p.S194L в гомозиготном состоянии в гене *DSG2* была обнаружена у пробанда ARVD62II-1 29 л. с вероятным диагнозом АКПЖ, поставленным по диагностическим критериям Маркуса. Пробанд проживает в Республике Дагестан, родители пробанда являются двоюродными сибсами, что подтверждает общее происхождение аллелей. Учитывая этот факт был проведен каскадный семейный скрининг родителям, а также супруге пробанда. Генетический вариант p.S194L в гетерозиготном состоянии в гене *DSG2* был обнаружен у матери и отца пробанда, у супруги данный вариант не обнаружен. Родословная семьи представлена на рис.26.



***Нет данных**

Рисунок 26. Родословная семьи ARVD62. Пробанд III-1 отмечен стрелкой.

Аминокислотный остаток дикого типа очень консервативен. При реконструкции мутантного белка десмоглеина в программе NOPE было показано, что мутантный аминокислотный остаток и аминокислотный остаток дикого типа различаются по гидрофобности, а именно мутантный аминокислотный остаток является более гидрофобным

(Рис. 27, 28). Это может приводить к потере водородных связей и/или нарушению правильного фолдинга белков [209].

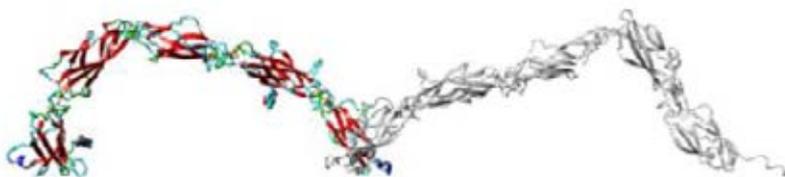


Рисунок 27. Изображение белка десмоглеина в виде «ленты». Цветами обозначены следующие элементы: синий - α -спираль, красный - β -нить, зеленый - виток, желтый - спираль 3/10, голубой - случайная спираль, серый – другие молекулы комплекса. Реконструкция в программе HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)

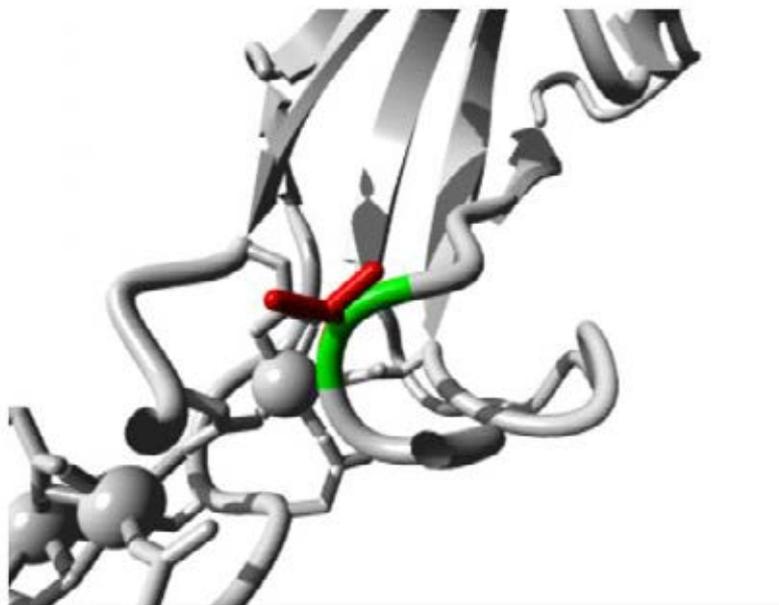


Рисунок 28. Изображение мутантного белка десмоглеина. Цветами обозначены следующие элементы: серый – белок десмоглеин, зеленый – аминокислотный остаток дикого типа, красный – мутантный аминокислотный остаток. Реконструкция в программе HOPE (<https://www3.cmbi.umcn.nl/hope>)

Таким образом, выявление мутации p.S194L в гомозиготном состоянии в гене *DSG2* внесло вклад в ДНК-диагностику заболевания, а учитывая общее происхождение аллелей (в одном случае доказано, в другом подразумевается), нами было предположено, что оба пробанда имеют общего предка.

Для проверки гипотезы об общем происхождении аллелей, нами был проведен анализ частоты минорного аллеля с.581C>T (p.S194L) в гене *DSG2* в группе 150 российских здоровых доноров, включая 20 здоровых доноров из р. Дагестан, и в группе 200 больных из Биобанка

РНЦХ, предположительно кавказского происхождения. Во всех исследованных образцах ДНК мутация p.S194L не была обнаружена, что может служить подтверждением гипотезы об общем предке для обеих семей.

2) мутация c.1523_1538del в гетерозиготном состоянии в гене *PKP2* была обнаружена в двух семьях.

Пробанд ARVD25, 34 г., страдал нарушением сердечного ритма, синкопальными и предсинкопальными состояниями. Семейный анамнез был отягощен по внезапной смерти: старшая сестра пробанда умерла внезапно умерла в возрасте 8 месяцев, двоюродный брат умер от ВСС в 18 лет в автобусе. С 5 лет на ЭКГ у пробанда регистрировали преждевременное сокращение желудочков (ПСЖ). Позднее обморок и пресинкопе повторялись много раз. В 20-летнем возрасте пробанду была выполнена радиочастотная абляция (РЧА) аритмогенного очага в выводном тракте ПЖ без клинического эффекта. Детектировали более 20000 желудочковых эктопий по результатам мониторинга по Холтеру. В дальнейшем пробанду был имплантирован ИКД. На ЭКГ регистрировался отрицательный зубец Т и ε-волна (V₁-V₃). У пробанда выполнялись 6 больших и 2 малых диагностических критерия АКПЖ, что соответствует достоверному диагнозу [149].

Выявленная делеция 16 нуклеотидов: c.1523_1538del в гетерозиготном состоянии в 7-м экзоне гена *PKP2* приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона (p.N508fs).

В дальнейшем делеция c.1523_1538del в гетерозиготном состоянии в 7-м экзоне гена *PKP2* была обнаружена у пробанда 24 л. с достоверным диагнозом АКПЖ, поставленным по диагностическим критериям Маркуса.

Данная делеция была нами признана вероятно патогенным генетическим вариантом (IV класс патогенности). На сегодняшний день, информации о родстве двух пробандов нет.

3.3.4. Возможные варианты-модификаторы в генах АКПЖ

Результатом проведенной ДНК-диагностики у пациентов как европейского, так и азиатского происхождения было обнаружение не только единичных гетерозиготных мутаций, но также явления компаунд- и дигенной гетерозиготности, известной при АКПЖ [50, 188].

Для большинства форм АКПЖ характерен аутосомно-доминантный тип наследования с неполной пенетрантностью и вариабельной экспрессивностью [50]. Есть сообщения о том, что более одного потенциально патогенного варианта обнаруживается в генах *PKP2*, *DSG2* и *DSP* у пациентов с АКПЖ, хотя такие пациенты составляют лишь небольшую часть исследованных выборок [11, 74, 210, 211]. В нашей выборке больных с АКПЖ дигенные и компаунд-гетерозиготы были обнаружены у 6 (7,5%) пробандов.

В семье ARVD77 родители пробанда, носители одного генетического варианта неустоановленного значения, были бессимптомными, в то время как у пробанда 36 л. наблюдалась развернутая картина АКПЖ (Рис. 29).

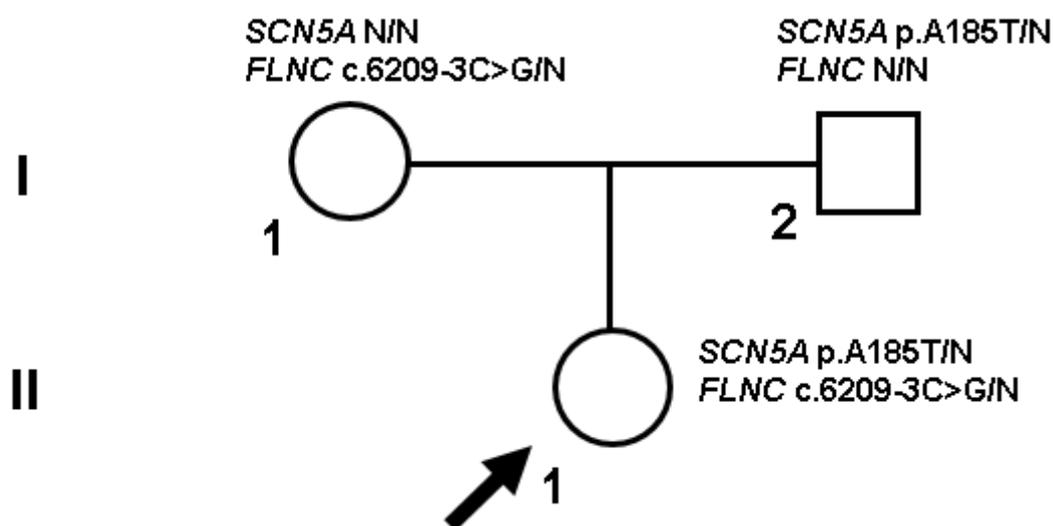


Рисунок 29. Родословная семьи ARVD77. Пробанд II-1 отмечен стрелкой.

В семье ARVD62 были обнаружены 2 генетических варианта: p.E1489D в гене *SCN5A*, коррелирующий с признаками КМП, а также вариант p.V30M в гене *DSP*, коррелирующий с эпсилон-волной на ЭКГ (Рис. 30). Вариант p.V30M в гене *DSP*, первоначально классифицированный нами как вариант неустоановленного значения, впоследствии был переклассифицирован как вероятно доброкачественный (II класс патогенности). Вариант локализован в N-концевой области белка *DSP*, который участвует в связывании с линкерными белками *JUP* и *PKP*. В исследовании Yang et al. было показано влияние варианта на локализацию белка *DSP* в экспериментах *in vitro* и нарушение связывающей способности N-концевой области белка [69]. На мышинной модели отмечена дилатация и уменьшение толщины стенки желудочка [69]. Несмотря на MAF 0.001495 (по данным gnomAD), превышающую частоту заболевания, оценка возможного модифицирующего влияние такого генетического варианта требует дополнительного исследования.

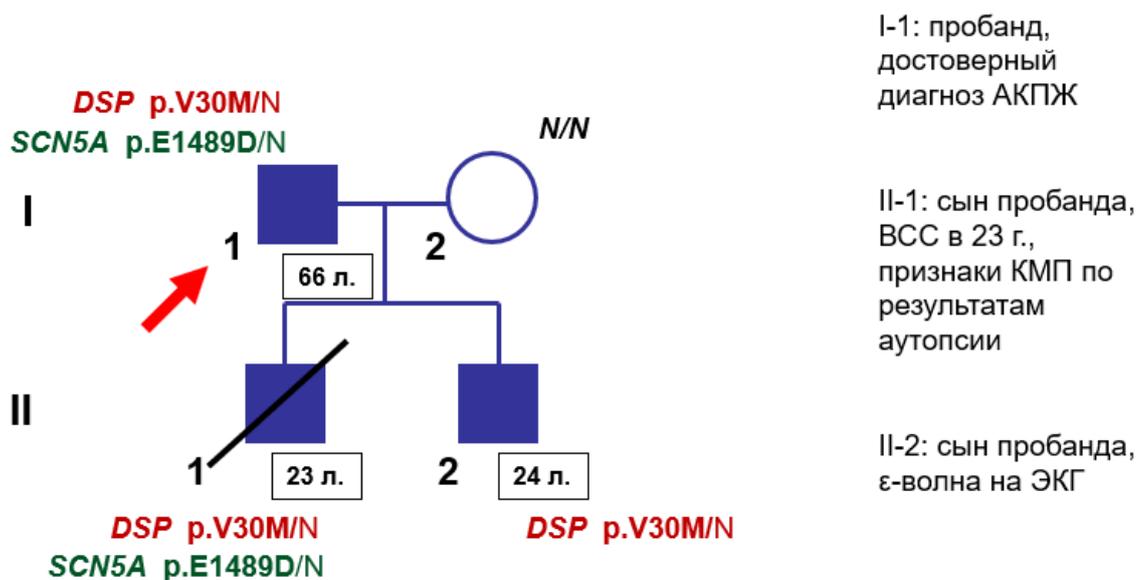


Рисунок 30. Родословная семьи ARVD71. Пробанд II-1 отмечен стрелкой.

На сегодняшний день, считается, что наличие дополнительного варианта в комплексе с мутацией может привести к повышенному фенотипическому проявлению АКПЖ (более раннее начало заболевания, тяжесть симптомов); или что одной мутации недостаточно для развития АКПЖ, но комбинация двух и более генетических вариантов может привести к манифестации заболевания. Эта концепция может объяснять неполную пенетрантность и вариабельную экспрессивность АКПЖ [50, 188].

3.3.5. Генетические варианты у пациентов с сочетанием АКПЖ с СНМЛЖ и повышенной трабекулярностью ЛЖ

В рамках нашего исследования был изучен спектр генетических вариантов у пациентов с уникальным сочетанием комплексного фенотипа двух типов кардиомиопатий: аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка и синдрома некомпактного миокарда левого желудочка (СНМЛЖ). В литературе встречаются лишь несколько описаний клинических случаев сочетания АКПЖ и СНМЛЖ, часто без результатов генетического тестирования.

Сочетание АКПЖ и СНМЛЖ было выявлено у 9 (11,25%) из 80 пробандов в нашей выборке. Всем 9 пробандам было проведено секвенирование двух целевых панелей генов: панели генов АКПЖ и панели генов СНМЛЖ. В одном образце ДНК пробанда (postmortem) было проведено полноэкзомное секвенирование.

Варианты IV-V классов патогенности были выявлены у 4-х пробандов: в гене *DSP* (с.1141-2A>G; с.3583delinsAАТАТАGТ), и в саркомерных генах *MYH7* (с.709C>Т, р.Р237W; с.728G>А, р.Р243Н) и *MYBPC3* (с.3697C>Т, р.Q1233*).

У пробандов были выявлены VUSes в десмосомных генах (в гене *DSP* - с.2622C>G (р.І874M); в гене *DSC2* - с.1436G>А (р.Р479Н)), и в не-десмосомных генах (в гене *LDB3* - с.1051A>G (р.Т351А)). По результатам полноэкзомного секвенирования образца умершего пациента был выявлен VUS с.86160A>Т (р.Е28720D) в гене *TTN*, оценка функциональной значимости которого требует дополнительного исследования.

Таким образом, как генетические варианты IV-V классов патогенности, так и варианты неустановленного значения в нашей выборке пациентов были обнаружены как в десмосомных генах, ассоциированных преимущественно с АКПЖ, так и в не-десмосомных генах (саркомерных и ассоциированных с саркомерами генах), ассоциированных с СНМЛЖ.

Кроме того, в нашей выборке были выявлены 6 (7,5%) пробандов с сочетанием АКПЖ и повышенной трабекулярности ЛЖ, не достигающей диагностических критериев СНМЛЖ [207]. Для всех 6 пробандов мы также провели секвенирование двух таргетных панелей генов.

Вероятно патогенный генетический вариант с.2347C>Т (р.Р783С) в саркомерном гене *MYH7* был обнаружен у одного пробанда с таким сочетанием. У остальных 5-ти пациентов потенциально патогенных генетических вариантов не обнаружено.

3.3.6. Ре-интерпретация генетических вариантов у пациентов с АКПЖ

В нашей работе мы столкнулись с необходимостью ре-интерпретации генетических находок, которую на сегодняшний день обсуждают во всем мире в контексте коммуникации с пациентами после получения обновленной информации о генетическом варианте [212]. Клиническое значение выявленных ранее генетических вариантов нуждается в ре-интерпретации с течением времени, поскольку появляются новые данные о его патогенности или ее отсутствии.

За время проведения исследования выявленные генетические варианты были нами ре-интерпретированы. Ре-интерпретацию генетических вариантов осуществляли согласно Рекомендациям Американской Коллегии Медицинской генетики и геномики и Ассоциации молекулярной патологии (ACMG) [116], Руководству по интерпретации данных, полученных методами массового параллельного секвенирования [126], рекомендации для отдельного гена и типов генетических вариантов [176, 177], с использованием литературных и биоинформатических данных.

Ре-интерпретация была проведена для более, чем 100 генетических вариантов у пациентов с АКПЖ и в группе пациентов с ДКМП. После проведения ре-интерпретации ранее выявленных нами генетических вариантов 18 генетических вариантов поменяли свой «статус».

В большинстве случаев класс патогенности снижался: от патогенного/вероятно патогенного до варианта с неустановленным значением; от варианта с неустановленным значением до вероятно доброкачественного генетического варианта. Причину понижения класса можно объяснить накопленными данными о частоте минорного аллеля по данным масштабных генетических проектов (ExAC, gnomAD), в сравнении с распространенностью заболевания.

Однако, наблюдалось и повышение класса патогенности, в частности, при оценке вариантов в гене *MYH7* благодаря появлению адаптированных критериев для этого гена, в которых четко обозначено число пробандов-носителей варианта для применения того или иного критерия. Также появилось небольшое число отчетов о результатах функциональных исследований, подтверждающих патогенность вариантов [177]. С использованием биоинформатических протоколов при сравнении частот редких генетических вариантов были разработаны подходы для оценки критериев ACMG PM2/BS1, PS4 и PM1 для синдрома Бругада и LQTS, что позволило повысить III класс патогенности до IV-V класса в 19,2%/82,1% случаев заболевания, соответственно [213].

Одним из генетических вариантов, обнаруженных нами у 3-х пробандов из выборки, был генетический вариант с.934C>T (p.R312W) в гетерозиготном состоянии в 11 экзоне гена *TMEM43*, ранее описанный в 2013 г. как мутация «основателя» в Канаде и Великобритании [214]. В данной работе 2013 г. были исследованы генетические варианты p.R28W, p.E142K, p.R312W в гене *TMEM43*, все обследованные пациенты не имели известной «частой» мутации p.S358L, описанной в статье 2008 г. [30]. Выявленный генетический вариант p.R312W был обнаружен у пациентов, выполнявших диагностические критерии АКПЖ 2010 г. [149], а также сегрегировал в семьях больных с такими предикторами, как внезапная аритмическая смерть в молодом возрасте (до 40 лет), синкопальные состояния. Генотипирование носителей варианта p.R312W из Великобритании и провинции Ньюфаундленда (Канада) привело исследователей к выводу, что данный генетический вариант, наряду с p.S358L, - это мутация «основателя» [214], несмотря на то, что вариант был обнаружен и в здоровой выборке (частота минорного аллеля (MAF) составила 0,008 в британской популяции и 0,028 в голландской).

В то время признание варианта p.R312W патогенным нашло отражение в базах данных LOVD, ARVD/C Genetic Variants Database, ClinVar, цитировалось в научной литературе. Соответственно, при обработке данных NGS генетический вариант не был аннотирован как полиморфизм, с чем столкнулись и мы в нашей работе.

За последние годы получено много данных крупномасштабных проектов по секвенированию геномов человека. На сегодняшний день, генетический вариант p.R312W в гене *TMEM43* указан с MAF 0,00985 (gnomAD), 0,009% (ExAC), 0,008% (TOPMED). Т.е. частота минорного аллеля для данного генетического варианта намного превышает описанную частоту аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка в популяции.

Введение в практику современных рекомендаций [116, 126] позволило нам по-новому интерпретировать и классифицировать выявленные генетические варианты. Используя рекомендации, генетический вариант p.R312W в гене *TMEM43* (часто встречающийся в здоровой популяции, но охарактеризованный *in silico* как «вредоносный») был нами интерпретирован как «доброкачественный».

На сегодняшний день в базе данных ClinVar данный вариант классифицирован как «benign» (доброкачественный) по данным от нескольких независимых лабораторий.

Аналогично варианту p.R312W в гене *TMEM43*, генетический вариант c.419C>T (p.S140F) в гене *PKP2* неоднократно был нами обнаружен у пациентов с АКПЖ и был ранее описан как «патогенный» во многих публикациях (около 20). До сих пор в ARVD/C Genetic Variants Database [53] он индексирован как патогенный, несмотря на масштабное исследование этого генетического варианта, включающее данные более 10 тыс. человек из общей популяции, исследования *in vitro* в клеточной системе, и клинические данные пациентов с КМП, опубликованное в 2016 г. в European Journal of Human Genetics [215]. Генетический вариант c.419C>T (p.S140F) в гене *PKP2* был признан вариантом, не связанным с аритмиями, ХСН, АКПЖ и другими типами КМП.

Таким образом, доказательная база для переосмысления клинического значения генетического варианта с течением времени постоянно расширяется.

3.3.7. Анализ корреляций «фенотип-генотип» для различных групп пациентов

В рамках нашего исследования мы изучали корреляции «фенотип-генотип» в группах пациентов с АКПЖ. Мы проанализировали тяжесть клинических проявлений у носителей патогенных, вероятно патогенных и генетических вариантов не установленного значения и у пациентов с АКПЖ, у которых патогенные/вероятно патогенные/генетические варианты не установленного значения обнаружить не удалось.

Анализ корреляций был проведен среди пар следующих независимых групп пациентов после получения результатов ДНК-диагностики:

1) пациентов с выявленными патогенными, вероятно патогенными и генетическими вариантами неустановленного значения и пациентов без выявленных генетических вариантов;

2) пациентов с выявленными патогенными, вероятно патогенными генетическими вариантами и пациентов без выявленных генетических вариантов.

Достоверные различия были обнаружены между группой пациентов с генетическими вариантами III-V классов патогенности и группой пациентов, у которых генетических вариантов III-V классов патогенности выявлено не было. Количество пациентов в каждой группе, клинические и анамнестические особенности пациентов и результаты статистического анализа представлены в таблице 24.

Среди носителей патогенных, вероятно патогенных и вариантов неустановленного значения значительно преобладали мужчины по сравнению с пациентами без выявленных генетических вариантов ($p=0,013$). У носителей патогенных, вероятно патогенных и вариантов неустановленного значения отмечен более ранний возраст появления первых симптомов заболевания по сравнению с группой пациентов без выявленных генетических вариантов ($p=0,022$).

Таблица 24. Анамнестические и клинические особенности пациентов, в зависимости от наличия генетических вариантов III-V классов патогенности.

	Носители патогенных, вероятно патогенных и вариантов неустановленного значения (N=40)	Без вариантов (N=40)	p-value	Статистическая значимость
Возраст	36,5±14,6	40,3±14,5	0,242	Недостоверно
Пол	3М:2Ж	13М:27Ж	0,013	Достоверно
Достоверный диагноз до проведения ДНК-диагностики	25/40	20/40	0,265	Недостоверно
Эпсилон-волна	14/40	7/40	0,077	Недостоверно
Вероятный диагноз до проведения ДНК-диагностики	8/40	16/40	0,052	Недостоверно
Возраст появления первых симптомов заболевания, л.	24,5±11,1	31,9±14,8	0,022	Достоверно

Среди носителей патогенных, вероятно патогенных генетических вариантов и пациентов, у которых генетических вариантов III-V классов патогенности выявлено не было, были обнаружены следующие достоверные различия:

1) достоверно чаще наблюдалась эпсилон-волна на ЭКГ у носителей патогенных, вероятно патогенных генетических вариантов;

2) отмечен более ранний возраст появления первых симптомов заболевания у носителей патогенных, вероятно патогенных генетических вариантов;

3) чаще отмечался отягощенный анамнез по ВСС и заболеваниям сердца (семейный и личный) у носителей патогенных, вероятно патогенных генетических вариантов;

4) чаще наблюдалась картина синдрома ДКМП у носителей патогенных, вероятно патогенных генетических вариантов.

Количество пациентов в каждой группе, клинические и анамнестические особенности пациентов и результаты статистического анализа представлены в таблице 25.

Таблица 25. Анамнестические и клинические особенности пациентов, в зависимости от наличия генетических вариантов IV-V классов патогенности.

	Носители патогенных и вероятно патогенных вариантов (N=21)	Пациенты без выявленных вариантов (N=40)	p-value	Статистическая значимость
Возраст, л.	33,8±14,7	40,3±14,5	0,103	Недостоверно
Пол	11М: 10Ж	13М: 27Ж	0,135	Недостоверно
Достоверный диагноз до проведения ДНК-диагностики	13/21	20/40	0,384	Недостоверно
Эпсилон-волна	9/21	7/40	0,033	Достоверно
Возраст появления первых симптомов заболевания, л.	23,7±12,2	31,9±14,8	0,039	Достоверно
Отягощенный анамнез по ВСС и заболеваниям сердца (семейный и личный)	10/21	4/40	<0,001	Достоверно
Картина синдрома ДКМП	8/21	5/40	0,020	Достоверно

Исходя из полученных результатов можно предположить, что наличие патогенного/вероятно патогенного генетического варианта коррелирует с тяжестью клинических проявлений заболевания.

Учитывая, что в семьях пробандов с генетическими вариантами IV-V классов патогенности частота ВСС была достоверно выше, чем в других группах, необходимо проводить каскадный семейный скрининг с целью организации динамического наблюдения для носителей вероятно патогенных и патогенных генетических вариантов.

3.3.8. Алгоритм молекулярно-генетической диагностики больных с АКПЖ

В выборке больных с АКПЖ нами изучен молекулярно-генетический полиморфизм заболевания. Генетическая вариабельность АКПЖ, а также полиморфизм клинических проявлений, «перекрывающиеся» фенотипы с другими типами КМП требуют определения объема и стратегии ДНК-диагностики для таких больных.

На основании проведенного анализа эффективности ДНК-диагностики для пациентов с АКПЖ мы предлагаем алгоритм молекулярно-генетического исследования, представленный на Рис. 31.

Для пациентов с АКПЖ, а также с сочетанием АКПЖ с другими типами кардиомиопатий наиболее оптимальной стратегией ДНК-диагностики представляется секвенирование таргетной панели генов, кодирующих десмосомы и связанные с ними белки, с последующей интерпретацией. Для пациентов с сочетанием АКПЖ и СНМЛЖ или повышенной трабекулярностью ЛЖ, мы рекомендуем также секвенировать панель генов, кодирующих саркомерные и связанные с ними белки.

В случае отсутствия выявленных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов по результатам секвенирования таргетных панелей генов, мы рекомендуем проводить полноэкзомное секвенирование (WES), а при отсутствии патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в результатах WES – определение вариаций числа копий.

В случае выявления патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов у пробанда рекомендован каскадный семейный скрининг для кровных родственников пробанда. По результатам каскадного семейного скрининга требуется динамическое наблюдение для носителей таких генетических вариантов, для неносителей – не требуется.

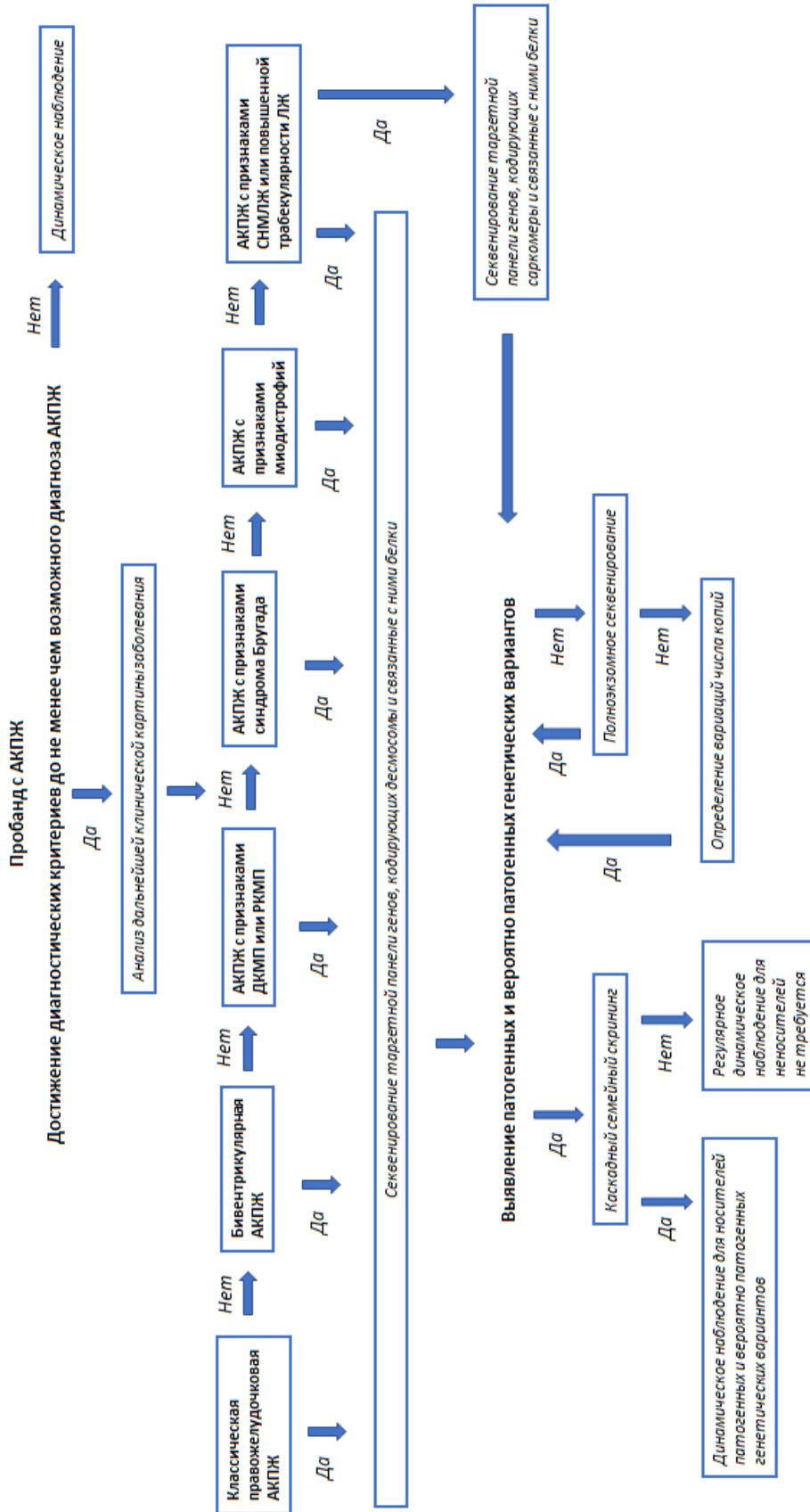


Рисунок 31. Предлагаемый алгоритм ДНК-диагностики пробанда с направляющим диагнозом "Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка".

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка – это наследственное заболевание, связанное с риском внезапной сердечной смерти. В настоящее время лечение АКПЖ проводится в основном эмпирически, с целью профилактики внезапной сердечной смерти и предотвращения жизнеугрожающих аритмий, а также снижения прогрессирования ХСН. Роль мутаций десмосом у большинства пациентов с АКПЖ подчеркивают критическую функцию этих структурных элементов в сердце, которые сохраняют целостность кардиомиоцитов в циклических процессах сокращения и расслабления.

За последние 15 лет молекулярно-генетические исследования привели к выявлению широкого спектра из более чем 1400 генетических вариантов в 12 генах, ассоциированных с АКПЖ [53]. Хотя 413 патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов описаны у пациентов с АКПЖ, молекулярная причина остается не выявленной примерно у 50% пробандов; а часть находок представляет собой генетические варианты с неустановленным значением. Это означает, что мутации в других неоткрытых генах или варианты-модификаторы могут вносить вклад в патогенез заболевания. Очевидно, поиск новых генов-кандидатов остается одним из подходов в ДНК-диагностике АКПЖ.

Генетическая гетерогенность и клинические особенности заболевания (неполная пенетрантность, варьируемая экспрессивность) затрудняют процесс медико-генетического консультирования больных с АКПЖ. Высокая доля семейных случаев заболевания влечет за собой запрос на разработку ДНК-диагностики для пациентов с АКПЖ.

Идентификация патогенного/вероятно патогенного генетического варианта является большим критерием в категории «семейный анамнез» для постановки диагноза заболевания [149, 150]. Однако, сложности, связанные с фенотипированием больных при клиническом обследовании, ограничениями существующих методов секвенирования и корректной интерпретацией получаемых генетических данных являются факторами, которые напрямую влияют на эффективность ДНК-диагностики больных с АКПЖ.

Впервые нами была собрана репрезентативная выборка из 80 российских пробандов с АКПЖ. В нашей работе мы проанализировали результаты ДНК-диагностики как в общей выборке из 80 больных с АКПЖ, так и в подгруппах больных с достоверным, вероятным и возможным диагнозами АКПЖ. Всего было выявлено 22 генетических варианта IV-V классов патогенности, 63,6% которых приводили к прекращению синтеза белка: нонсенс-мутации, мутации со сдвигом открытой рамки считывания, изменения канонических нуклеотидов сайта

сплайсинга. Большая часть (68,2%) из них была выявлена в десмосомных генах *PKP2* и *DSP*. Соотношение «мутация:VUS» в результатах ДНК-диагностики составило 0,85:1.

Генетические варианты III-V классов патогенности были обнаружены в десмосомных и не-десмосомных генах у 50% больных общей выборки; этот показатель составил 55,6% отдельно в подгруппе с достоверным диагнозом, 33,3% - с вероятным диагнозом, 60% - с возможным диагнозом [149]. Однако, генетические варианты IV-V классов патогенности (1 большой диагностический критерий заболевания) [149] были обнаружены у 21 (26,25%) пробанда из выборки.

Ожидается, что биоинформатические подходы, которые основаны на анализе большого количества нуклеотидных последовательностей, могут ре-классифицировать генетические варианты, в настоящее время классифицированные как VUSes. Например, исследователи недавно определили регионы генов, в которых кластеризуются неусекающиеся варианты у пациентов с ГКМП в сравнении с контрольной группой, что привело к предполагаемому увеличению на 14-20% диагностической эффективности для таких больных [216].

Бивентрикулярная и леводоминирующая (аритмогенная кардиомиопатия левого желудочка) формы заболевания чаще описывают в клинике, термин «аритмогенная кардиомиопатия сердца» был предложен для включения обоих фенотипов [150].

На основании различий в диагностической эффективности ДНК-диагностики для разных групп пациентов нами предложен дифференциальный алгоритм, который учитывает анатомический вариант ремоделирования миокарда. В группе больных с сочетанием АКПЖ+СНМЛЖ преобладали генетические варианты III-V классов патогенности как в десмосомных генах, ассоциированных преимущественно с АКПЖ, так и в не-десмосомных генах (саркомерных и ассоциированных с саркомерами генах), ассоциированных с СНМЛЖ.

Однако, при сравнении спектров генетических вариантов III-V классов патогенности у пробандов с АКПЖ в сравнении с группой ДКМП нами было отмечено значительное преобладание таких вариантов в генах десмосом у пробандов с АКПЖ: 30% vs 12%.

Обнаружено, что наличие патогенного и вероятно патогенного генетического варианта коррелирует с тяжестью клинических проявлений АКПЖ.

С помощью методов NGS детектируют новые генетические варианты, ассоциированные с другими типами кардиомиопатий [112, 217], поэтому применение этих методов в ДНК-диагностике АКПЖ выглядит многообещающим. Также при отсутствии мутаций в генах из диагностического списка АКПЖ, большие надежды возлагаются на Секвенирование третьего поколения (3rd generation NGS) для проверки наличия или отсутствия крупных делеций/инсерций внутри генов.

На примере таргетных панелей генов, эффективность применения которых была доказана при проведении ДНК-диагностики АКПЖ, и архивных хроматограмм нами был исследован феномен «выпадения» аллеля и его вклад в снижение точности и диагностического выхода генетического тестирования. Исследование данного феномена может быть продолжено и на других панелях генов и других нозологиях, а полученные результаты могут быть применимы для разработки биоинформатических ресурсов для поиска потенциальных регионов «выпадения» аллеля.

Аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка ассоциирована с нарушением структуры и функции генов, кодирующих белки десмо-адгезома. На примере АКПЖ может быть исследована ультраструктура мутантных десмосом и ассоциированных с ними белков. Кроме того, пациенты с АКПЖ могут быть кандидатами для применения технологии геномного редактирования с использованием системы CRISPR/Cas9.

ВЫВОДЫ

1. В обследованной когорте из 80 пробандов с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка были выявлены 48 генетических вариантов III-V класса патогенности с частотой менее 0,043%. Наибольшее количество находок были сосредоточены в генах, кодирующих десмосомные белки. В генах *PKP2* и *DSP* были локализованы 39,6% всех редких вариантов. Миссенс-замены составили 60,4%, остальные замены реализовались через механизм гаплонедостаточности (нонсенс-мутации, мутации со сдвигом рамки считывания, мутации сплайсинга).

Подавляющее большинство редких вариантов были уникальными. Только два варианта (с.1523_1538del в гетерозиготном состоянии в гене *PKP2* и p.S194L в гомозиготном состоянии в гене *DSG2*) встретились более, чем в одной семье.

2. В генах, кодирующих не-десмосомные белки миокарда, были выявлены 20 вариантов III-V класса патогенности у 16 (20%) пробандов из выборки. Отмечено преобладание генетических вариантов III-V классов патогенности в десмосомных генах (58,3%) по сравнению с не-десмосомными (41,6%) у пробандов с АКПЖ.

3. Выявляемость генетических вариантов IV-V классов патогенности в таргетной панели генов составила 45,83% от всех выявленных редких вариантов. В генах *PKP2* и *DSP* находились 50,0% всех вариантов IV-V классов патогенности. Диагностическая эффективность исследования зависела от уровня достоверности диагноза. Наибольшее число диагностически значимых находок было выявлено в группе пациентов с достоверным диагнозом (30,5%). Частых мутаций, мутаций с эффектом основателя в обследованной выборке не выявлено. Соотношение «мутация:VUS» составило 0,85:1.

4. Продемонстрировано, что явление «выпадения» аллеля (ADO) – феномен, значимо влияющий на точность детекции генетических вариантов методами как массового параллельного секвенирования на платформе Ion Torrent, так и капиллярного секвенирования. Основной причиной ADO является локализация SNV(s) в области праймер-связывающего сайта. Снижение эффективности амплификации может затрагивать до 0,77% ампликонов в мультипраймерных панелях.

5. Генотип-позитивные пробанды с АКПЖ имели достоверно более выраженные фенотипические проявления АКПЖ: более ранний возраст манифестации заболевания (23,7 л. vs 31,9 л.), чаще регистрировалась эпсилон-волна на ЭКГ (0,43 vs 0,17), чаще имелиотягощенный семейный анамнез (47,6% vs 10%). Выявление генетического варианта IV-V класса патогенности является фактором, указывающим на серьезный прогноз заболевания.

6. Генетические варианты III-V класса патогенности в не-десмосомных генах преобладали у пробандов с сочетанием АКПЖ и другими типами кардиомиопатий. Оптимальная стратегия ДНК-диагностики при АКПЖ должна учитывать вариант ремоделирования миокарда.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика показаны пробанду и членам семьи, у которых выполняются диагностические критерии аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка.
2. Пациентам с аритмогенной кардиомиопатией правого желудочка целесообразно проводить ДНК-диагностику в таргетной панели генов: *PKP2, DSG2, DSP, DSC2, TMEM43, JUP, TGFB3, PLN, LMNA, DES, EMD, SCN5A, LDB3, CRYAB, CTNNA3, FLNC*.
3. Пациентам с АКПЖ и СНМЛЖ также целесообразно проводить ДНК-диагностику в таргетной панели генов: *MYH7, MYBPC3, TPM1, ACTC1, LMNA, DES, TNNT2, DTNA, LDB3, TNNI3, TAZ, MYL2, MYL3*.
4. Пациентам с АКПЖ в случае отсутствия выявленных патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов по результатам секвенирования таргетных панелей генов целесообразно проводить полноэкзомное секвенирование, а при отсутствии патогенных и вероятно патогенных генетических вариантов в результатах WES – определение вариаций числа копий.
5. Обнаружение генетического варианта III класса патогенности не может служить основанием для утяжеления прогноза заболевания и/или для проведения пренатальной ДНК-диагностики.
6. При обнаружении у пробанда генетического варианта IV-V классов патогенности показано проведение каскадного семейного скрининга родственникам I-II степени родства.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Описание и выявление новых генетических вариантов у пациентов с АКПЖ (включая применение методов WES, WGS, определение CNVs) наряду с детальным фенотипированием позволит уточнить возможные корреляции «генотип-фенотип». Следовательно, это позволит повысить эффективность медико-генетического консультирования и оценивать риски жизнеугрожающих событий.

2. По мере накопления данных о генетических вариантах в определенных генах и типах ремоделирования миокарда могут быть выделены отдельные формы заболевания: десмосомная АКПЖ (плакофилиновая, десмоплакиновая), саркомерная АКПЖ и т.д., ассоциированные с мутациями в соответствующих генах.

3. Представляется целесообразным провести повторный анализ связи генетических вариантов у пациентов с диагнозом «АКПЖ» в свете публикации новых критериев диагностики заболевания 2020 г. (Падуанские критерии) после их валидации на больших группах пациентов.

4. Особый интерес представляет анализ «частых» мутаций в выборках АКПЖ, общего происхождения аллелей, частот редких генетических вариантов в разных этнических группах.

5. Представляется необходимым дальнейшее изучение вклада феномена «выпадения» аллеля в снижение точности ДНК-диагностики: детекции новых случаев ADO, описание причин и типов ADO, а также разработки эффективных алгоритмов для избегания ADO при дизайне праймеров для ПЦР-опосредованных методов секвенирования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ACMG – American College of Medical Genetics (Американская Коллегия Медицинской генетики)
- ADO – Allelic dropout («выпадение» аллеля)
- AF – allele frequency (частота аллеля)
- CNV - Copy number variation (вариация числа копий)
- ExAC – Exome Aggregation Consortium
- HDR - Homology Directed Repair (гомологично направленная репарация)
- gnomAD - The Genome Aggregation Database
- IGV - Integrative Genomic Viewer
- iPSC - induced pluripotent stem cells (индуцированные плюрипотентные стволовые клетки)
- LQTS - Long QT syndrome (синдром удлиненного интервала QT)
- MAF – minor allele frequency (частота минорного аллеля)
- MLPA - Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (Метод мультиплексной амплификации лигированных зондов)
- NGS - Next Generation Sequencing (Секвенирование нового поколения)
- NHEJ - Non-Homologous End Joining (негомологичное соединение концов)
- SNP– Single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)
- SNV – Single nucleotide variation (однонуклеотидный генетический вариант)
- VUS – variant of uncertain significance (вариант неустановленного значения)
- WES - Whole Exome Sequencing (полноэкзомное секвенирование)
- WGS - Whole Genome Sequencing (полногеномное секвенирование)
- АКЛЖ – аритмогенная кардиомиопатия левого желудочка
- АКПЖ – аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка
- б/д – база данных
- ВСС – внезапная сердечная смерть
- ГКМП – гипертрофическая кардиомиопатия
- ДКМП – дилатационная кардиомиопатия
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЖТ – желудочковая тахикардия
- ЖЭС – желудочковая экстрасистолия
- ИКД – имплантируемый кардиовертер-дефибриллятор
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КМП – кардиомиопатия

МРТ – магнитно-резонансная томография

МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография

н/д – нет данных

НКМ – некомпактный миокард

ПААГ - полиакриламидный гель

п.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РКМП – рестриктивная кардиомиопатия

РНК – рибонуклеиновая кислота

РЧА - радиочастотная абляция

ПЖ – правый желудочек

ЛЖ – левый желудочек

ФВ – фракция выброса

ХСН – хроническая сердечная недостаточность

ЭКГ – Электрокардиограмма

ЭхоКГ - эхокардиография

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marcus F.I. Right ventricular dysplasia: A report of 24 adult cases / Marcus F.I., Fontaine G.H., Guiraudon G., Frank R., Laurenceau J.L., Malergue C., Grosgeat Y. // *Annals of Noninvasive Electrocardiology* – 1999. – Т. 4 – № 1 – С.97–111.
2. Tabib A. Circumstances of Death and Gross and Microscopic Observations in a Series of 200 Cases of Sudden Death Associated with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and/or Dysplasia / Tabib A., Loire R., Chalabreysse L., Meyronnet D., Miras A., Malicier D., Thivolet F., Chevalier P., Bouvagnet P. // *Circulation* – 2003. – Т. 108 – № 24 – С.3000–3005.
3. Dalal D. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: A United States experience / Dalal D., Nasir K., Bomma C., Prakasa K., Tandri H., Piccini J., Roguin A., Tichnell C., James C., Russell S.D., Judge D.P., Abraham T., Spevak P.J., Bluemke D.A., Calkins H. // *Circulation* – 2005. – Т. 112 – № 25 – С.3823–3832.
4. Гордеева М.В. Аритмогенная кардиомиопатия/дисплазия правого желудочка как причина внезапной сердечной смерти молодых людей / Гордеева М.В., Митрофанова Л.Б., Пахомов А.В., Велеславова О.Е., Берман М.В., Иевлева Е.Л., Лаврентюк Г.П., Платонов П.Г., Шубик Ю.В. // *Вестник аритмологии* – 2012. – Т. 69 – № 69 – С.38–48.
5. Kowalczyk A.P. Structure, function, and regulation of desmosomes / Kowalczyk A.P., Green K.J. // *Progress in Molecular Biology and Translational Science* – 2013. – Т. 116 – С.95–118.
6. He W. Untangling desmosomal knots with electron tomography / He W., Cowin P., Stokes D.L. // *Science* – 2003. – Т. 302 – № 5642 – С.109–113.
7. Medeiros-Domingo A. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Implications of next-generation sequencing in appropriate diagnosis / Medeiros-Domingo A., Saguner A.M., Magyar I., Bahr A., Akdis D., Brunckhorst C., Duru F., Berger W. // *Europace* – 2017. – Т. 19 – № 6 – С.1063–1069.
8. Cirillo N. Desmosomal interactome in keratinocytes: A systems biology approach leading to an understanding of the pathogenesis of skin disease / Cirillo N., Prime S.S. // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2009. – Т. 66 – № 21 – С.3517–3533.
9. Huber O. 150th Anniversary Series: Desmosomes and the Hallmarks of Cancer / Huber O., Petersen I. // *Cell Communication & Adhesion* – 2015. – Т. 22 – № 1 – С.15–28.
10. Celentano A. Pathophysiology of the Desmo-Adhesome / Celentano A., Mignogna M.D., McCullough M., Cirillo N. // *Journal of Cellular Physiology* – 2017. – Т. 232 – № 3 – С.496–505.
11. Xu T. Compound and Digenic Heterozygosity Contributes to Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Xu T., Yang Z., Vatta M., Rampazzo A., Beffagna G., Pillichou K., Scherer S.E.,

- Saffitz J., Kravitz J., Zareba W., Danieli G.A., Lorenzon A., Nava A., Bauce B., Thiene G., Basso C., Calkins H., Gear K., Marcus F., Towbin J.A. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2010. – T. 55 – № 6 – C.587–597.
12. Gandjbakhch E. Screening of genes encoding junctional candidates in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Gandjbakhch E., Vite A., Gary F., Fressart V., Donal E., Simon F., Hidden-Lucet F., Komajda M., Charron P., Villard E. // *Europace* – 2013. – T. 15 – № 10 – C.1522–1525.
13. Cirillo N. 150th anniversary series: Desmosomes in physiology and disease / Cirillo N. // *Cell Communication and Adhesion* – 2014. – T. 21 – № 2 – C.85–88.
14. Green K.J. Desmosomes: New perspectives on a classic / Green K.J., Simpson C.L. // *Journal of Investigative Dermatology* – 2007. – T. 127 – № 11 – C.2499–2515.
15. Kitajima Y. 150th Anniversary series: Desmosomes and autoimmune disease, perspective of dynamic desmosome remodeling and its impairments in pemphigus / Kitajima Y. // *Cell Communication and Adhesion* – 2014. – T. 21 – № 6 – C.269–280.
16. Corrado D. Treatment of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: An international task force consensus statement / Corrado D., Wichter T., Link M.S., Hauer R., Marchlinski F., Anastakis A., Bauce B., Basso C., Brunckhorst C., Tsatsopoulou A., Tandri H., Paul M., Schmied C., Pelliccia A., Duru F., Protonotarios N., Estes N.A.M., McKenna W.J., Thiene G., Marcus F.I., Calkins H. // *European Heart Journal* – 2015. – T. 36 – № 46 – C.3227–3237.
17. Fontaine G. ARVD back in force AM J Card 2014 / Fontaine G., Chen H.V. // *Am J Cardiol.* – 2014. – T. 113 – № 10 – C.1735–1739.
18. DePasquale E.C. Survival After Heart Transplantation in Patients With Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / DePasquale E.C., Cheng R.K., Deng M.C., Nsair A., McKenna W.J., Fonarow G.C., Jacoby D.L. // *Journal of Cardiac Failure* – 2017. – T. 23 – № 2 – C.107–112.
19. McKenna W.J. Classification, epidemiology, and global burden of cardiomyopathies / McKenna W.J., Maron B.J., Thiene G. // *Circulation Research* – 2017. – T. 121 – № 7 – C.722–730.
20. Gerlis L. Uhl ' s anomaly / Gerlis L. // *Orphanet encyclopedia* – 2003. – № January – C.1–3.
21. Mckenna W.J. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia / cardiomyopathy B ,, / Mckenna W.J., Thiene G., Nava A., Fontaliran F., Blomstrom-lundqvist C., Fontaine G., Camerini F., Blomstrom-lundqvist C., Corrado D., Patologica A., East B.S., Mckenna W., Nava A. – 1994. – C.215–218.
22. Rampazzo A. The gene for arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy maps to chromosome 14q23-q24 / Rampazzo A., Nava A., Danieli G.A., Buja G., Daliento L., Fasoli G., Scognamiglio R., Corrado D., Thlene G. // *Human Molecular Genetics* – 1994. – T. 3 – № 6 – C.959–962.

23. Oomen A.W.G.J. Diagnosis of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Progress and Pitfalls / Oomen A.W.G.J., Semsarian C., Puranik R., Sy R.W. // Heart Lung and Circulation – 2018. – T. 27 – № 11 – C.1310–1317.
24. Severini G.M. A new locus for arrhythmogenic right ventricular dysplasia on the long arm of chromosome 14 / Severini G.M., Krajinovic M., Pinamonti B., Sinagra G., Fioretti P., Brunazzi M.C., Falaschi A., Camerini F., Giacca M., Mestroni L., Lenarda A. Di, Lardieri G., Morgera T., Silvestri F., Bussani R., Davanzo M., Vatta M., Milasin J. // Genomics – 1996. – T. 31 – № 2 – C.193–200.
25. Rampazzo A. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1 (ARVD1): Confirmation of locus assignment and mutation screening of four candidate genes / Rampazzo A., Beffagna G., Nava A., Occhi G., Bauce B., Noiato M., Basso C., Frigo G., Thiene G., Towbin J., Danieli G.A. // European Journal of Human Genetics – 2003. – T. 11 – № 1 – C.69–76.
26. Beffagna G. Regulatory mutations in transforming growth factor- β 3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1 / Beffagna G., Occhi G., Nava A., Vitiello L., Ditadi A., Basso C., Bauce B., Carraro G., Thiene G., Towbin J.A., Danieli G.A., Rampazzo A. // Cardiovascular Research – 2005. – T. 65 – № 2 – C.366–373.
27. McKoy G. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) / McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J. // Lancet – 2000. – T. 355 – № 9221 – C.2119–2124.
28. Tiso N. Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2) / Tiso N., Stephan D.A., Nava A., Bagattin A., Devaney J.M., Stanchi F., Larderet G., Brahmhatt B., Brown K., Bauce B., Muriago M., Basso C., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. // Human Molecular Genetics – 2001. – T. 10 – № 3 – C.189–194.
29. Bauce B. Clinical profile of four families with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by dominant desmoplakin mutations / Bauce B., Basso C., Rampazzo A., Beffagna G., Daliento L., Frigo G., Malacrida S., Settimo L., Danieli G.A., Thiene G., Nava A. // European Heart Journal – 2005. – T. 26 – № 16 – C.1666–1675.
30. Merner N.D. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Type 5 Is a Fully Penetrant, Lethal Arrhythmic Disorder Caused by a Missense Mutation in the TMEM43 Gene / Merner N.D., Hodgkinson K.A., Haywood A.F.M., Connors S., French V.M., Drenckhahn J.D., Kupprion C., Ramadanova K., Thierfelder L., McKenna W., Gallagher B., Morris-Larkin L., Bassett A.S., Parfrey P.S., Young T.L. // American Journal of Human Genetics – 2008. – T. 82 – № 4 – C.809–821.
31. Rampazzo A. Mutation in human desmoplakin domain binding to plakoglobin causes a dominant

- form of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Rampazzo A., Nava A., Malacrida S., Beffagna G., Bauce B., Rossi V., Zimbello R., Simionati B., Basso C., Thiene G., Towbin J.A., Danieli G.A. // *American Journal of Human Genetics* – 2002. – T. 71 – № 5 – C.1200–1206.
32. Pilichou K. Mutations in desmoglein-2 gene are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Pilichou K., Nava A., Basso C., Beffagna G., Bauce B., Lorenzon A., Frigo G., Vettori A., Valente M., Towbin J., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. // *Circulation* – 2006. – T. 113 – № 9 – C.1171–1179.
33. Gerull B. Mutations in the desmosomal protein plakophilin-2 are common in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Gerull B., Heuser A., Wichter T., Paul M., Basson C.T., McDermott D.A., Lerman B.B., Markowitz S.M., Ellinor P.T., MacRae C.A., Peters S., Grossmann K.S., Michely B., Sasse-Klaassen S., Birchmeier W., Dietz R., Breithardt G., Schulze-Bahr E., Thierfelder L. // *Nature Genetics* – 2004. – T. 36 – № 11 – C.1162–1164.
34. Syrris P. Clinical expression of plakophilin-2 mutations in familial arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Syrris P., Ward D., Asimaki A., Sen-Chowdhry S., Ebrahim H.Y., Evans A., Hitomi N., Norman M., Pantazis A., Shaw A.L., Elliott P.M., McKenna W.J. // *Circulation* – 2006. – T. 113 – № 3 – C.356–364.
35. Asimaki A. A novel dominant mutation in plakoglobin causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Asimaki A., Syrris P., Wichter T., Matthias P., Saffitz J.E., McKenna W.J. // *American Journal of Human Genetics* – 2007. – T. 81 – № 5 – C.964–973.
36. Hengel J. Van Mutations in the area composita protein at-catenin are associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Hengel J. Van, Calore M., Bauce B., Dazzo E., Mazzotti E., Bortoli M. De, Lorenzon A., Li Mura I.E.A., Beffagna G., Rigato I., Vleeschouwers M., Tyberghein K., Hulpiou P., Hamme E. Van, Zaglia T., Corrado D., Basso C., Thiene G., Daliento L., Nava A., Roy F. Van, Rampazzo A. // *European Heart Journal* – 2013. – T. 34 – № 3 – C.201–210.
37. Quarta G. Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Quarta G., Syrris P., Ashworth M., Jenkins S., Zuborne Alapi K., Morgan J., Muir A., Pantazis A., McKenna W.J., Elliott P.M. // *European Heart Journal* – 2012. – T. 33 – № 9 – C.1128–1136.
38. Zwaag P.A. Van Der Phospholamban R14del mutation in patients diagnosed with dilated cardiomyopathy or arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Evidence supporting the concept of arrhythmogenic cardiomyopathy / Zwaag P.A. Van Der, Rijsingen I.A.W. Van, Asimaki A., Jongbloed J.D.H., Veldhuisen D.J. Van, Wiesfeld A.C.P., Cox M.G.P.J., Lochem L.T. Van, Boer R.A. De, Hofstra R.M.W., Christiaans I., Spaendonck-Zwarts K.Y. Van, Deprez R.H.L.D., Judge D.P., Calkins H., Suurmeijer A.J.H., Hauer R.N.W., Saffitz J.E., Wilde A.A.M., Berg M.P. Van Den,

Tintelen J.P. Van // *European Journal of Heart Failure* – 2012. – T. 14 – № 11 – C.1199–1207.

39. Taylor M. Genetic variation in titin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy-overlap syndromes / Taylor M., Graw S., Sinagra G., Barnes C., Slavov D., Brun F., Pinamonti B., Salcedo E.E., Sauer W., Pyxaras S., Anderson B., Simon B., Bogomolovas J., Labeit S., Granzier H., Mestroni L. // *Circulation* – 2011. – T. 124 – № 8 – C.876–885.

40. Tintelen J.P. van Severe cardiac phenotype with right ventricular predominance in a large cohort of patients with a single missense mutation in the DES gene / Tintelen J.P. van, Gelder I.C. Van, Asimaki A., Suurmeijer A.J.H., Wiesfeld A.C.P., Jongbloed J.D.H., Wijngaard A. van den, Kuks J.B.M., Spaendonck-Zwarts K.Y. van, Notermans N., Boven L., Heuvel F. van den, Veenstra-Knol H.E., Saffitz J.E., Hofstra R.M.W., Berg M.P. van den // *Heart Rhythm* – 2009. – T. 6 – № 11 – C.1574–1583.

41. Campuzano O. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Campuzano O., Alcalde M., Allegue C., Iglesias A., García-Pavía P., Partemi S., Oliva A., Pascali V.L., Berne P., Sarquella-Brugada G., Brugada J., Brugada P., Brugada R. // *Journal of Medical Genetics* – 2013. – T. 50 – № 5 – C.280–289.

42. Towbin J.A. 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy / Towbin J.A., McKenna W.J., Abrams D.J., Ackerman M.J., Calkins H., Darrieux F.C.C., Daubert J.P., Chillou C. de, DePasquale E.C., Desai M.Y., Estes N.A.M., Hua W., Indik J.H., Ingles J., James C.A., John R.M., Judge D.P., Keegan R., Krahn A.D., Link M.S., Marcus F.I., McLeod C.J., Mestroni L., Priori S.G., Saffitz J.E., Sanatani S., Shimizu W., Tintelen J.P. van, Wilde A.A.M., Zareba W. // *Heart Rhythm* – 2019. – T. 16 – № 11 – C.e301–e372.

43. Basso C. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: What's in a name? from a congenital defect (Dysplasia) to a genetically determined cardiomyopathy (Dystrophy) / Basso C., Corrado D., Thiene G. // *American Journal of Cardiology* – 2010. – T. 106 – № 2 – C.275–277.

44. Garcia-gras E. Suppression of canonical Wnt/ β -catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. / Garcia-gras E., Lombardi R., Giocondo M.J., Willerson J.T., Schneider M.D., Khoury D.S., Marian A.J. // *The Journal of clinical investigation*. – 2006. – T. 116 – № 7 – C.2012–2021.

45. Chelko SP. Central role for GSK3 β in the pathogenesis of arrhythmogenic cardiomyopathy / Chelko SP, Asimaki A, Andersen P, Bedja D, Amat-Alarcon N, DeMazumder D, Jasti R, MacRae CA, Leber R, Kleber AG, Saffitz JE J.D. // *JCI Insight* – 2016. – T. 1 – № 5.

46. James C.A. The role of genetics in cardiovascular disease: Arrhythmogenic cardiomyopathy / James C.A., Syrris P., Tintelen J.P. Van, Calkins H. // *European Heart Journal* – 2020. – T. 41 – № 14

– C.1393–1400.

47. Cox M.G.P.J. Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Diagnostic Task Force Criteria impact of new Task Force Criteria / Cox M.G.P.J., Smagt J.J. Van Der, Noorman M., Wiesfeld A.C., Volders P.G.A., Langen I.M. Van, Atsma D.E., Dooijes D., Houweling A.C., Loh P., Jordaens L., Arens Y., Cramer M.J., Doevendans P.A., Tintelen J.P. Van, Wilde A.A.M., Hauer R.N.W. // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* – 2010. – T. 3 – № 2 – C.126–133.

48. Corrado D. Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases / Corrado D., Thiene G., Nava A., Rossi L., Pennelli N. // *The American Journal of Medicine* – 1990. – T. 89 – № 5 – C.588–596.

49. Bhonsale A. Impact of genotype on clinical course in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy-associated mutation carriers / Bhonsale A., Groeneweg J.A., James C.A., Dooijes D., Tichnell C., Jongbloed J.D.H., Murray B., Riele A.S.J.M. Te, Berg M.P. Van Den, Bikker H., Atsma D.E., Groot N.M. De, Houweling A.C., Heijden J.F. Van Der, Russell S.D., Doevendans P.A., Veen T.A. Van, Tandri H., Wilde A.A., Judge D.P., Tintelen J.P. Van, Calkins H., Hauer R.N. // *European Heart Journal* – 2015. – T. 36 – № 14 – C.847–855.

50. James C.A. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Evidence for progression increases / James C.A., Calkins H. // *European Heart Journal* – 2020. – T. 41 – № 14 – C.1411–1413.

51. Ruwald A.C. Association of competitive and recreational sport participation with cardiac events in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Results from the North American multidisciplinary study of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopath / Ruwald A.C., Marcus F., Estes N.A.M., Link M., McNitt S., Polonsky B., Calkins H., Towbin J.A., Moss A.J., Zareba W. // *European Heart Journal* – 2015. – T. 36 – № 27 – C.1735–1743.

52. Chivulescu M. High penetrance and similar disease progression in probands and in family members with arrhythmogenic cardiomyopathy / Chivulescu M., Lie O.H., Popescu B.A., Skulstad H., Edvardsen T., Jurcut R.O., Haugaa K.H. // *European Heart Journal* – 2020. – T. 41 – № 14 – C.1401–1410.

53. Zwaag P.A. Van Der A genetic variants database for arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy / Zwaag P.A. Van Der, Jongbloed J.D.H., Berg M.P. Van Den, Smagt J.J. Van Der, Jongbloed R., Bikker H., Hofstra R.M.W., Tintelen J.P. Van // *Human Mutation* – 2009. – T. 30 – № 9 – C.1278–1283.

54. Tintelen J.P. Van Molecular genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Emerging horizon? / Tintelen J.P. Van, Hofstra R.M.W., Wiesfeld A.C.P., Berg M.P. Van Den, Hauer R.N.W., Jongbloed J.D.H. // *Current Opinion in Cardiology* – 2007. – T. 22 – № 3 – C.185–192.

55. Marcus F.I. Genetics of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: A practical guide for

physicians // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2013. – T. 61. – № 19. – 1945–1948c.

56. Groeneweg J.A. Clinical Presentation, Long-Term Follow-Up, and Outcomes of 1001 Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia/Cardiomyopathy Patients and Family Members / Groeneweg J.A., Bhonsale A., James C.A., Riele A.S. Te, Dooijes D., Tichnell C., Murray B., Wiesfeld A.C.P., Sawant A.C., Kassamali B., Atsma D.E., Volders P.G., Groot N.M. De, Boer K. De, Zimmerman S.L., Kamel I.R., Heijden J.F. Van Der, Russell S.D., Jan Cramer M., Tedford R.J., Doevendans P.A., Veen T.A. Van, Tandri H., Wilde A.A., Judge D.P., Tintelen J.P. Van, Hauer R.N., Calkins H. // *Circulation: Cardiovascular Genetics* – 2015. – T. 8 – № 3 – C.437–446.

57. Ortiz-Genga M.F. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies / Ortiz-Genga M.F., Cuenca S., Dal Ferro M., Zorio E., Salgado-Aranda R., Climent V., Padrón-Barthe L., Duro-Aguado I., Jiménez-Jáimez J., Hidalgo-Olivares V.M., García-Campo E., Lanzillo C., Suárez-Mier M.P., Yonath H., Marcos-Alonso S., Ochoa J.P., Santomé J.L., García-Giustiniani D., Rodríguez-Garrido J.L., Domínguez F., Merlo M., Palomino J., Peña M.L., Trujillo J.P., Martín-Vila A., Stolfo D., Molina P., Lara-Pezzi E., Calvo-Iglesias F.E., Nof E., Calò L., Barriales-Villa R., Gimeno-Blanes J.R., Arad M., García-Pavía P., Monserrat L. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2016. – T. 68 – № 22 – C.2440–2451.

58. Mayosi B.M. Identification of Cadherin 2 (CDH2) Mutations in Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Mayosi B.M., Fish M., Shaboodien G., Mastantuono E., Kraus S., Wieland T., Kotta M.C., Chin A., Laing N., Ntusi N.B.A., Chong M., Horsfall C., Pimstone S.N., Gentilini D., Parati G., Strom T.M., Meitinger T., Pare G., Schwartz P.J., Crotti L. // *Circulation: Cardiovascular Genetics* – 2017. – T. 10 – № 2.

59. Moric-Janiszewska E. Review on the genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia / Moric-Janiszewska E., Markiewicz-Łoskot G. // *Europace* – 2007. – T. 9 – № 5 – C.259–266.

60. Ohno S. Age-dependent clinical and genetic characteristics in Japanese patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Ohno S., Nagaoka I., Fukuyama M., Kimura H., Itoh H., Makiyama T., Shimizu A., Horie M. // *Circulation Journal* – 2013. – T. 77 – № 6 – C.1534–1542.

61. Lazzarini E. The ARVD/C genetic variants database: 2014 update / Lazzarini E., Jongbloed J.D.H., Pilichou K., Thiene G., Basso C., Bikker H., Charbon B., Swertz M., Tintelen J.P. van, Zwaag P.A. van der // *Human Mutation* – 2015. – T. 36 – № 4 – C.403–410.

62. Kapplinger J.D. Distinguishing arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia-associated mutations from background genetic noise / Kapplinger J.D., Landstrom A.P., Salisbury B.A., Callis T.E., Pollevick G.D., Tester D.J., Cox M.G.P.J., Bhuiyan Z., Bikker H., Wiesfeld A.C.P., Hauer R.N.W., Tintelen J.P. Van, Jongbloed J.D.H., Calkins H., Judge D.P., Wilde A.A.M., Ackerman

- M.J. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2011. – T. 57 – № 23 – C.2317–2327.
63. Heijden J.F. van der The phospholamban p.Arg14del founder mutation in Dutch patients with arrhythmogenic cardiomyopathy / Heijden J.F. van der, Hassink R.J. // *Netherlands Heart Journal* – 2013. – T. 21 – № 6 – C.284–285.
64. Grossmann K.S. Requirement of plakophilin 2 for heart morphogenesis and cardiac junction formation / Grossmann K.S., Grund C., Huelsken J., Behrend M., Erdmann B., Franke W.W., Birchmeier W. // *Journal of Cell Biology* – 2004. – T. 167 – № 1 – C.149–160.
65. Awad M.M. Recessive arrhythmogenic right ventricular dysplasia due to novel cryptic splice mutation in PKP2. / Awad M.M., Dalal D., Tichnell C., James C., Tucker A., Abraham T., Spevak P.J., Calkins H., Judge D.P. // *Human mutation* – 2006. – T. 27 – № 11 – C.1157.
66. Christensen A.H. Wide spectrum of desmosomal mutations in Danish patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Christensen A.H., Benn M., Bundgaard H., Tybjærg-Hansen A., Haunso S., Svendsen J.H. // *Journal of Medical Genetics* – 2010. – T. 47 – № 11 – C.736–744.
67. Fedida J. Contribution of exome sequencing for genetic diagnostic in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Fedida J., Fressart V., Charron P., Surget E., Hery T., Richard P., Donal E., Keren B., Duthoit G., Hidden-Lucet F., Villard E., Gandjbakhch E. // *PLoS ONE* – 2017. – T. 12 – № 8 – C.1–14.
68. Saito M. Classical and desmosomal cadherins at a glance / Saito M., Tucker D.K., Kohlhorst D., Niessen C.M., Kowalczyk A.P. // *Journal of Cell Science* – 2012. – T. 125 – № 11 – C.2547–2552.
69. Yang Z. Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy / Yang Z., Bowles N.E., Scherer S.E., Taylor M.D., Kearney D.L., Ge S., Nadvoretzkiy V. V., DeFreitas G., Carabello B., Brandon L.I., Godsel L.M., Green K.J., Saffitz J.E., Li H., Danieli G.A., Calkins H., Marcus F., Towbin J.A. // *Circulation Research* – 2006. – T. 99 – № 6 – C.646–655.
70. Smith E.D. Desmoplakin Cardiomyopathy, a Fibrotic and Inflammatory Form of Cardiomyopathy Distinct from Typical Dilated or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Smith E.D., Lakdawala N.K., Papoutsidakis N., Aubert G., Mazzanti A., McCanta A.C., Agarwal P.P., Arscott P., Dellefave-Castillo L.M., Vorovich E.E., Nutakki K., Wilsbacher L.D., Priori S.G., Jacoby D.L., McNally E.M., Helms A.S. // *Circulation* – 2020. – T. 141 – № 23 – C.1872–1884.
71. Norgett E.E. Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma / Norgett E.E., Hatsell S.J., Carvajal-Huerta L., Cabezas J.C.R., Common J., Purkis P.E., Whittock N., Leigh I.M., Stevens H.P., Kelsell D.P. // *Human Molecular Genetics* – 2000. – T. 9 – № 18 – C.2761–2766.

72. Carvajal-Huerta L. Epidermolytic palmoplantar keratoderma with woolly hair and dilated cardiomyopathy / Carvajal-Huerta L. // *Journal of the American Academy of Dermatology* – 1998. – T. 39 – № 3 – C.418–421.
73. Alcalai R. A recessive mutation in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia, skin disorder, and woolly hair / Alcalai R., Metzger S., Rosenheck S., Meiner V., Chajek-Shaul T. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2003. – T. 42 – № 2 – C.319–327.
74. Fressart V. Desmosomal gene analysis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy: Spectrum of mutations and clinical impact in practice / Fressart V., Duthoit G., Donal E., Probst V., Deharo J.C., Chevalier P., Klug D., Dubourg O., Delacretaz E., Cosnay P., Scanu P., Extramiana F., Keller D., Hidden-Lucet F., Simon F., Bessirard V., Roux-Buisson N., Hebert J.L., Azarine A., Casset-Senon D., Rouzet F., Lecarpentier Y., Fontaine G., Coirault C., Frank R., Hainque B., Charron P. // *Europace* – 2010. – T. 12 – № 6 – C.861–868.
75. Keller D.I. De novo heterozygous desmoplakin mutations leading to Naxos-Carvajal disease / Keller D.I., Stepowski D., Balmer C., Simon F., Guenthard J., Bauer F., Itin P., David N., Drouin-Garraud V., Fressart V. // *Swiss Medical Weekly* – 2012. – T. 142 – № w13670.
76. Heuser A. Mutant desmocollin-2 causes arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Heuser A., Plovie E.R., Ellinor P.T., Grossmann K.S., Shin J.T., Wichter T., Basson C.T., Lerman B.B., Sasse-Klaassen S., Thierfelder L., MacRae C.A., Gerull B. // *American Journal of Human Genetics* – 2006. – T. 79 – № 6 – C.1081–1088.
77. McKoy G. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease) / McKoy G., Protonotarios N., Crosby A., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Coonar A., Norman M., Baboonian C., Jeffery S., McKenna W.J. // *Lancet* – 2000. – T. 355 – № 9221 – C.2119–2124.
78. Protonotarios N.I. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy caused by a deletion in plakoglobin (Naxos disease) / Protonotarios N.I., Tsatsopoulou A.A., Gatzoulis K.A. // *Cardiac Electrophysiology Review* – 2002. – T. 6 – № 1–2 – C.72–80.
79. Protonotarios N. Genotype-phenotype assessment in autosomal recessive arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (Naxos Disease) caused by a deletion in plakoglobin / Protonotarios N., Tsatsopoulou A., Anastasakis A., Sevdalis E., McKoy G., Stratos K., Gatzoulis K., Tentolouris K., Spiliopoulou C., Panagiotakos D., McKenna W., Toutouzas P. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2001. – T. 38 – № 5 – C.1477–1484.
80. Kaplan S.R. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease) / Kaplan S.R., Gard J.J., Protonotarios N., Tsatsopoulou A., Spiliopoulou C., Anastasakis A., Squarcioni C.P., McKenna W.J.,

- Thiene G., Basso C., Brousse N., Fontaine G., Saffitz J.E. // *Heart Rhythm* – 2004. – T. 1 – № 1 – C.3–11.
81. Doetschman T. Transforming growth factor beta signaling in adult cardiovascular diseases and repair / Doetschman T., Barnett J. V., Runyan R.B., Camenisch T.D., Heimark R.L., Granzier H.L., Conway S.J., Azhar M. // *Cell and Tissue Research* – 2012. – T. 347 – № 1 – C.203–223.
82. Heldin C.H. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition / Heldin C.H., Landström M., Moustakas A. // *Current Opinion in Cell Biology* – 2009. – T. 21 – № 2 – C.166–176.
83. MacLennan D.H. The regulation of SERCA-type pumps by phospholamban and sarcolipin / MacLennan D.H., Asahi M., Tupling A.R. // *Annals of the New York Academy of Sciences* – 2003. – T. 986 – C.472–480.
84. Cerra M.C. Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates / Cerra M.C., Imbrogno S. // *Acta Physiologica* – 2012. – T. 205 – C.9–25.
85. Posch M.G. Genetic deletion of arginine 14 in phospholamban causes dilated cardiomyopathy with attenuated electrocardiographic R amplitudes / Posch M.G., Perrot A., Geier C., Boldt L.H., Schmidt G., Lehmkuhl H.B., Hetzer R., Dietz R., Gutberlet M., Haverkamp W., Özcelik C. // *Heart Rhythm* – 2009. – T. 6 – № 4 – C.480–486.
86. Yamada S. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex / Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W.I., Nelson W.J. // *Cell* – 2005. – T. 123 – № 5 – C.889–901.
87. Janssens B. α T-catenin: A novel tissue-specific β -catenin-binding protein mediating strong cell-cell adhesion / Janssens B., Goossens S., Staes K., Gilbert B., Hengel J. Van, Colpaert C., Bruyneel E., Mareel M., Roy F. Van // *Journal of Cell Science* – 2001. – T. 114 – № 17 – C.3177–3188.
88. Janssens B. Assessment of the CTNNA3 gene encoding human α T-catenin regarding its involvement in dilated cardiomyopathy / Janssens B., Mohapatra B., Vatta M., Goossens S., Vanpoucke G., Kools P., Montoye T., Hengel J. Van, Bowles N.E., Roy F. Van, Towbin J.A. // *Human Genetics* – 2003. – T. 112 – № 3 – C.227–236.
89. Li J. Loss of α T-catenin alters the hybrid adhering junctions in the heart and leads to dilated cardiomyopathy and ventricular arrhythmia following acute ischemia / Li J., Goossens S., Hengel J. van, Gao E., Cheng L., Tyberghein K., Shang X., Rycke R. De, Roy F. van, Radice G.L. // *Journal of Cell Science* – 2012. – T. 125 – № 4 – C.1058–1067.
90. Stewart C.L. Life at the edge: The nuclear envelope and human disease / Stewart C.L., Stewart C.L. // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2002. – T. 3 – № 8 – C.575–585.
91. Carboni N. Cardiac involvement in patients with lamin A/C gene mutations: A cohort observation / Carboni N., Sardu C., Cocco E., Marrosu G., Manzi R.C., Nissardi V., Isola F., Mateddu A., Solla E.,

- Maioli M.A., Oppo V., Piras R., Coghe G., Lai C., Marrosu M.G. // *Muscle and Nerve* – 2012. – T. 46 – № 2 – C.187–192.
92. Larsen M.K. Molecular autopsy in young sudden cardiac death victims with suspected cardiomyopathy / Larsen M.K., Nissen P.H., Berge K.E., Leren T.P., Kristensen I.B., Jensen H.K., Banner J. // *Forensic Science International* – 2012. – T. 219 – № 1–3 – C.33–38.
93. Zhenlin L. Human desmin-coding gene: complete nucleotide sequence, characterization and regulation of expression during myogenesis and development / Zhenlin L., Lilienbaum A., Butler-Browne G., Paulin D. // *Gene* – 1989. – T. 78 – № 2 – C.243–254.
94. Otten E. Desmin mutations as a cause of right ventricular heart failure affect the intercalated disks / Otten E., Asimaki A., Maass A., Langen I.M. Van, Wal A. Van Der, Jonge N. De, Berg M.P. Van Den, Saffitz J.E., Wilde A.A.M., Jongbloed J.D.H., Tintelen J.P. Van // *Heart Rhythm* – 2010. – T. 7 – № 8 – C.1058–1064.
95. Lorenzon A. Desmin mutations and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Lorenzon A., Beffagna G., Bauce B., Bortoli M. De, Li Mura I.E.A., Calore M., Dazzo E., Basso C., Nava A., Thiene G., Rampazzo A. // *American Journal of Cardiology* – 2013. – T. 111 – № 3 – C.400–405.
96. Anderson B.R. Titin-based tension in the cardiac sarcomere: molecular origin and physiological adaptations / Anderson B.R., Granzier H.L. // *Prog Biophys Mol Biol.* – 2012. – T. 110 – № 2–3 – C.204–217.
97. Zaklyazminskaya E. The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies / Zaklyazminskaya E., Dzemeshevich S. // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* – 2016. – T. 1863 – № 7 – C.1799–1805.
98. Riele A.S.J.M. Te Multilevel analyses of SCN5A mutations in arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy suggest non-canonical mechanisms for disease pathogenesis / Riele A.S.J.M. Te, Agullo-Pascual E., James C.A., Leo-Macias A., Cerrone M., Zhang M., Lin X., Lin B., Rothenberg E., Sobreira N.L., Amat-Alarcon N., Marsman R.F., Murray B., Tichnell C., Heijden J.F. Van Der, Dooijes D., Veen T.A.B. Van, Tandri H., Fowler S.J., Hauer R.N.W., Tomaselli G., Berg M.P. Van Den, Taylor M.R.G., Brun F., Sinagra G., Wilde A.A.M., Mestroni L., Bezzina C.R., Calkins H., Tintelen J.P. Van, Bu L., Delmar M., Judge D.P. // *Cardiovascular Research* – 2017. – T. 113 – № 1 – C.102–111.
99. Cerrone M. Sodium current deficit and arrhythmogenesis in a murine model of plakophilin-2 haploinsufficiency / Cerrone M., Noorman M., Lin X., Chkourko H., Liang F.X., Nagel R. Van Der, Hund T., Birchmeier W., Mohler P., Veen T.A. Van, Rijen H. V. Van, Delmar M. // *Cardiovascular Research* – 2012. – T. 95 – № 4 – C.460–468.
100. Sato P.Y. Interactions between ankyrin-G, plakophilin-2, and connexin43 at the cardiac

- intercalated disc / Sato P.Y., Coombs W., Lin X., Nekrasova O., Green K.J., Isom L.L., Taffet S.M., Delmar M. // *Circulation Research* – 2011. – T. 109 – № 2 – C.193–201.
101. Cerrone M. Missense mutations in plakophilin-2 cause sodium current deficit and associate with a brugada syndrome phenotype / Cerrone M., Lin X., Zhang M., Agullo-Pascual E., Pfenniger A., Chkourko Gusky H., Novelli V., Kim C., Tirasawadichai T., Judge D.P., Rothenberg E., Chen H.S.V., Napolitano C., Priori S.G., Delmar M. // *Circulation* – 2014. – T. 129 – № 10 – C.1092–1103.
102. Noorman M. Remodeling of the cardiac sodium channel, connexin43, and plakoglobin at the intercalated disk in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy / Noorman M., Hakim S., Kessler E., Groeneweg J.A., Cox M.G.P.J., Asimaki A., Rijen H.V.M. Van, Stuijvenberg L. Van, Chkourko H., Heyden M.A.G. Van Der, Vos M.A., Jonge N. De, Smagt J.J. Van Der, Dooijes D., Vink A., Weger R.A. De, Varro A., Bakker J.M.T. De, Saffitz J.E., Hund T.J., Mohler P.J., Delmar M., Hauer R.N.W., Veen T.A.B. Van // *Heart Rhythm* – 2013. – T. 10 – № 3 – C.412–419.
103. Leo-Macias A. Nanoscale visualization of functional adhesion/excitability nodes at the intercalated disc / Leo-Macias A., Agullo-Pascual E., Sanchez-Alonso J.L., Keegan S., Lin X., Arcos T., Liang F.X., Korchev Y.E., Gorelik J., Fenyö D., Rothenberg E., Delmar M. // *Nature Communications* – 2016. – T. 7 – № 10342.
104. Melberg A. Autosomal dominant myofibrillar myopathy with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy linked to chromosome 10q / Melberg A., Oldfors A., Blomström-Lundqvist C., Ståhlberg E., Carlsson B., Larsson E., Lidell C., Eeg-Olofsson K.E., Wikström G., Henriksson K.G., Dahl N. // *Annals of Neurology* – 1999. – T. 46 – № 5 – C.684–692.
105. Zheng J. A novel mutation in the PDZ-like motif of ZASP causes distal ZASP-related myofibrillar myopathy / Zheng J., Chen S., Chen Y., Zhu M., Hong D. // *Neuropathology* – 2017. – T. 37 – № 1 – C.45–51.
106. Vatta M. Mutations in Cypher/ZASP in Patients with Dilated Cardiomyopathy and Left Ventricular Non-Compaction / Vatta M., Mohapatra B., Jimenez S., Sanchez X., Faulkner G., Perles Z., Sinagra G., Lin J.H., Vu T.M., Zhou Q., Bowles K.R., Lenarda A. Di, Schimmenti L., Fox M., Chrisco M.A., Murphy R.T., McKenna W., Elliott P., Bowles N.E., Chen J., Valle G., Towbin J.A. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2003. – T. 42 – № 11 – C.2014–2027.
107. Ackerman M.J. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies / Ackerman M.J., Priori S.G., Willems S., Berul C., Brugada R., Calkins H., Camm A.J., Ellinor P.T., Gollob M., Hamilton R., Hershberger R.E., Judge D.P., Marec H. Le, McKenna W.J., Schulze-Bahr E., Semsarian C., Towbin J.A., Watkins H., Wilde A., Wolpert C., Zipes D.P., Olson S. // *Europace* – 2011. – T. 13 – № 8 – C.1077–1109.
108. Lopez-Ayala JM. A mutation in the Z-line Cypher_ZASP protein is associated with

arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Lopez-Ayala JM, Ortiz-Genga M, Gomez-Milanes I, Lopez-Cuenca D, Ruiz-Espejo F, Sanchez-Munoz JJ, Oliva-Sandoval MJ, Monserrat L, JR. G. // *Clinical Genetics* – 2015. – T. 88 – № 2 – C.172–176.

109. Bortoli M. De Whole-Exome Sequencing Identifies Pathogenic Variants in TJP1 Gene Associated With Arrhythmogenic Cardiomyopathy / Bortoli M. De, Postma A. V., Poloni G., Calore M., Minervini G., Mazzotti E., Rigato I., Ebert M., Lorenzon A., Vazza G., Cipriani A., Bariani R., Perazzolo Marra M., Husser D., Thiene G., Daliento L., Corrado D., Basso C., Tosatto S.C.E., Baucé B., Tintelen J.P. van, Rampazzo A. // *Circulation. Genomic and precision medicine* – 2018. – T. 11 – № 10 – C.e002123.

110. Roberts J.D. Ankyrin-B dysfunction predisposes to arrhythmogenic cardiomyopathy and is amenable to therapy / Roberts J.D., Murphy N.P., Hamilton R.M., Mohler P.J. // *Journal of Clinical Investigation* – 2019. – T. 129 – № 8 – C.3171–3184.

111. Poloni G. A targeted next-generation gene panel reveals a novel heterozygous nonsense variant in the TP63 gene in patients with arrhythmogenic cardiomyopathy / Poloni G., Calore M., Rigato I., Marras E., Minervini G., Mazzotti E., Lorenzon A., Li Mura I.E.A., Telatin A., Zara I., Simionati B., Perazzolo Marra M., Ponti J., Occhi G., Vitiello L., Daliento L., Thiene G., Basso C., Corrado D., Tosatto S., Baucé B., Rampazzo A., Bortoli M. De // *Heart Rhythm* – 2019. – T. 16 – № 5 – C.773–780.

112. Robinson H.K. Biallelic variants in PPP1R13L cause paediatric dilated cardiomyopathy / Robinson H.K., Zaklyazminskaya E., Povolotskaya I., Surikova Y., Mallin L., Armstrong C., Mabin D., Benke P.J., Chrisant M.R., McDonald M., Marboe C.C., Agre K.E., Deyle D.R., McWalter K., Douglas G., Balashova M.S., Kaimonov V., Shirokova N., Pomerantseva E., Turner C.L., Ellard S. // *Clinical Genetics* – 2020. – T. 98 – № 4 – C.331–340.

113. Falik-Zaccai T.C. Sequence variation in PPP1R13L results in a novel form of cardio-cutaneous syndrome / Falik-Zaccai T.C., Barsheshet Y., Mandel H., Segev M., Lorber A., Gelberg S., Kalfon L., Haroush S. Ben, Shalata A., Gelernter-Yaniv L., Chaim S., Raviv Shay D., Khayat M., Werbner M., Levi I., Shoval Y., Tal G., Shalev S., Reuveni E., Avitan-Hersh E., Vlodayvsky E., Appl-Sarid L., Goldsher D., Bergman R., Segal Z., Bitterman-Deutsch O., Avni O. // *EMBO Molecular Medicine* – 2017. – T. 9 – № 3 – C.319–336.

114. Fokstuen S. Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice / Fokstuen S., Munoz A., Melacini P., Iliceto S., Perrot A., Özcelik C., Jeanrenaud X., Rieubland C., Farr M., Faber L., Sigwart U., Mach F., Lerch R., Antonarakis S.E., Blouin J.L. // *Journal of Medical Genetics* – 2011. – T. 48 – № 8 – C.572–576.

115. Collins F.S. First FDA Authorization for Next-Generation Sequencer / Collins F.S., Hamburg

- M.A. // *New England Journal of Medicine* – 2013. – T. 369 – № 25 – C.2369–2371.
116. Richards S. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology / Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W.W., Hegde M., Lyon E., Spector E., Voelkerding K., Rehm H.L. // *Genetics in Medicine* – 2015. – T. 17 – № 5 – C.405–424.
117. Li Mura I.E.A. Identification of a *pkp2* gene deletion in a family with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Li Mura I.E.A., Baucé B., Nava A., Fanciulli M., Vazza G., Mazzotti E., Rigato I., Bortoli M. De, Beffagna G., Lorenzon A., Calore M., Dazzo E., Nobile C., Luisa Mostacciolo M., Corrado D., Basso C., Daliento L., Thiene G., Rampazzo A. // *European Journal of Human Genetics* – 2013. – T. 21 – № 11 – C.1226–1231.
118. Roberts J.D. Detection of genomic deletions of *PKP2* in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Roberts J.D., Herkert J.C., Rutberg J., Nikkel S.M., Wiesfeld A.C.P., Dooijes D., Gow R.M., Tintelen J.P. van, Gollob M.H. // *Clinical Genetics* – 2013. – T. 83 – № 5 – C.452–456.
119. Tester D.J. Allelic dropout in long QT syndrome genetic testing: A possible mechanism underlying false-negative results / Tester D.J., Cronk L.B., Carr J.L., Schulz V., Salisbury B.A., Judson R.S., Ackerman M.J. // *Heart Rhythm* – 2006. – T. 3 – № 7 – C.815–821.
120. Jeong T.D. Significant allelic dropout phenomenon of oncomine BRCA research assay on ion torrent S5 / Jeong T.D., Cho S.Y., Kim M.W., Huh J. // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* – 2019. – T. 57 – № 6 – C.E124–E127.
121. Yared K. Cardiac sarcoidosis imitating arrhythmogenic right ventricular dysplasia / Yared K., Johri A.M., Soni A. V., Johnson M., Alkasab T., Cury R.C., Hung J., Mamuya W. // *Circulation* – 2008. – T. 118 – № 7 – C.113–115.
122. Quarta G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mimics: role of cardiovascular magnetic resonance / Quarta G, Husain SI, Flett AS, Sado DM, Chao CY, Tomé Esteban MT, McKenna WJ, Pantazis A M.J. // *J Cardiovasc Magn Reson.* – T. 15(1) – C.16.
123. Hauer R.N.W. Cardiac sarcoidosis mimicking definite arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Hauer R.N.W. // *Heart Rhythm* – 2021. – T. 18 – № 2 – C.239–240.
124. Christensen A.H. Cardiac myotonic dystrophy mimicking arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in a young sudden cardiac death victim. / Christensen A.H., Bundgaard H., Schwartz M., Hansen S.H., Svendsen J.H. // *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* – 2008. – T. 1 – № 4 – C.317–320.
125. Lint F.H.M. van Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy-Associated Desmosomal Variants Are Rarely De Novo / Lint F.H.M. van, Murray B., Tichnell C., Zwart R., Amat N., Lekanne

- Deprez R.H., Dittmann S., Stallmeyer B., Calkins H., Smagt J.J. van der, Wijngaard A. van den, Dooijes D., Zwaag P.A. van der, Schulze-Bahr E., Judge D.P., Jongbloed J.D.H., Tintelen J.P. van, James C.A. // *Circulation. Genomic and precision medicine* – 2019. – Т. 12 – № 8 – С.e002467.
126. Рыжкова О.П. Руководство По Интерпретации Данных Последовательности Днк Человека, Полученных Методами Массового Параллельного Секвенирования (Mps) (Редакция 2018, Версия 2) / Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б., Коновалов Ф.А., Масленников А.Б., Степанов В.А., Афанасьев А.А., Заключьминская Е.В., Ребриков Д.В., Савостьянов К.В., Глотов А.С., Костарева А.А., Павлов А.Е., Голубенко М.В., Поляков А.В., Куцев С.И. // *Медицинская Генетика* – 2019. – Т. 18 – № 2 – С.3–23.
127. Martins E.M. Consequences of primer binding-sites polymorphisms on genotyping practice / Martins E.M., Vilarinho L., Esteves S., Lopes-Marques M., Amorim A., Azevedo L. // *Open Journal of Genetics* – 2011. – Т. 01 – № 02 – С.15–17.
128. Navidi W. Using PCR in preimplantation genetic disease diagnosis. / Navidi W., Arnheim N. // *Human Reproduction* – 1992. – Т. 7 – № 2 – С.288.
129. Lissens W. Preimplantation genetic diagnosis: Current status and new developments / Lissens W., Sermon K. // *Human Reproduction* – 1997. – Т. 12 – № 8 – С.1756–1761.
130. Wang C. A maximum-likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes / Wang C., Schroeder K.B., Rosenberg N.A. // *Genetics* – 2012. – Т. 192 – № 2 – С.651–669.
131. Karnpean R. Accurate prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis in daily practice with a double-check PCR system / Karnpean R., Fucharoen G., Fucharoen S., Sae-Ung N., Sanchaisuriya K., Ratanasiri T. // *Acta Haematologica* – 2009. – Т. 121 – № 4 – С.227–233.
132. Wilton L. The causes of misdiagnosis and adverse outcomes in PGD / Wilton L., Thornhill A., Traeger-Synodinos J., Sermon K.D., Harper J.C. // *Human Reproduction* – 2009. – Т. 24 – № 5 – С.1221–1228.
133. Lam C.W. Allele dropout caused by a non-primer-site SNV affecting PCR amplification - A call for next-generation primer design algorithm / Lam C.W., Mak C.M. // *Clinica Chimica Acta* – 2013. – Т. 421 – С.208–212.
134. Wenzel J.J. Identification and prevention of genotyping errors caused by G-quadruplex- and i-motif-like sequences / Wenzel J.J., Rossmann H., Fottner C., Neuwirth S., Neukirch C., Lohse P., Bickmann J.K., Minnemann T., Musholt T.J., Schneider-Rätzke B., Weber M.M., Lackner K.J. // *Clinical Chemistry* – 2009. – Т. 55 – № 7 – С.1361–1371.
135. Coulet F. A one-step prescreening for point mutations and large rearrangement in BRCA1 and BRCA2 genes using quantitative polymerase chain reaction and high-resolution melting curve analysis

- / Coulet F., Pires F., Rouleau E., Lefol C., Martin S., Colas C., Cohen-Haguenauer O., Giurgea I., Fajac A., Noguès C., Demange L., Hardouin A., Lidereau R., Soubrier F. // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* – 2010. – T. 14 – № 5 – C.677–690.
136. Blais J. Risk of misdiagnosis due to allele dropout and false-positive PCR artifacts in molecular diagnostics analysis of 30,769 genotypes / Blais J., Lavoie S.B., Giroux S., Bussièrès J., Lindsay C., Dionne J., Laroche M., Giguère Y., Rousseau F. // *Journal of Molecular Diagnostics* – 2015. – T. 17 – № 5 – C.505–514.
137. Kim K.Y. A real-time PCR-based amelogenin y allele dropout assessment model in gender typing of degraded DNA samples / Kim K.Y., Kwon Y., Bazarragchaa M., Park A.J., Bang H., Lee W.B., Lee J., Lee K.H., Kim B.J., Kim K. // *International Journal of Legal Medicine* – 2013. – T. 127 – № 1 – C.55–61.
138. Askree S.H. Allelic dropout can cause false-positive results for prader-willi and Angelman syndrome testing / Askree S.H., Hjelm L.N., Pervaiz M.A., Adam M., Bean L.J.H., Hedge M., Coffee B. // *Journal of Molecular Diagnostics* – 2011. – T. 13 – № 1 – C.108–112.
139. Landsverk M.L. Diagnostic approaches to apparent homozygosity / Landsverk M.L., Douglas G. V., Tang S., Zhang V.W., Wang G.L., Wang J., Wong L.J.C. // *Genetics in Medicine* – 2012. – T. 14 – № 10 – C.877–882.
140. Takayama T. Identification of a rare mutation in a TH01 primer binding site / Takayama T., Takada N., Suzuki R., Nagaoka S., Watanabe Y. // *Legal Medicine* – 2007. – T. 9 – № 6 – C.289–292.
141. Saunders C.J. Allele drop-out in the MECP2 gene due to G-quadruplex and i-motif sequences when using polymerase chain reaction-based diagnosis for rett syndrome / Saunders C.J., Friez M.J., Patterson M., Nzabi M., Zhao W., Bi C. // *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* – 2010. – T. 14 – № 2 – C.241–247.
142. Medlock M.M. Repeat long QT syndrome genetic testing of phenotype-positive cases: Prevalence and etiology of detection misses / Medlock M.M., Tester D.J., Will M.L., Bos J.M., Ackerman M.J. // *Heart Rhythm* – 2012. – T. 9 – № 12 – C.1977–1982.
143. Rossetti S. Identification of gene mutations in autosomal dominant polycystic kidney disease through targeted resequencing / Rossetti S., Hopp K., Sikkink R.A., Sundsbak J.L., Lee Y.K., Kubly V., Eckloff B.W., Ward C.J., Winearls C.G., Torres V.E., Harris P.C. // *Journal of the American Society of Nephrology* – 2012. – T. 23 – № 5 – C.915–933.
144. Proost D. Improved molecular diagnostic testing for sudden cardiac death (Doctoral dissertation) / Proost D. – 2016.
145. Lutokhina Y. Clinical Classification of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy / Lutokhina Y., Blagova O., Nedostup A., Alexandrova S., Shestak A., Zaklyazminskaya E. // *Pulse* –

2020. – Т. 8 – № 1–2 – С.21–30.

146. Лутохина Ю.А. Клинические формы (классификация) аритмогенной дисплазии правого желудочка : особенности диагностики и лечения / Лутохина Ю.А., Благова О.В., Недоступ А.В., Шестак А.Г., Заклязьминская Е.В. // Российский кардиологический журнал – 2018. – Т. 2 (154) – С.19–31.

147. Chimenti C. Histologic findings in patients with clinical and instrumental diagnosis of sporadic arrhythmogenic right ventricular dysplasia / Chimenti C., Pieroni M., Maseri A., Frustaci A. // Journal of the American College of Cardiology – 2004. – Т. 43 – № 12 – С.2305–2313.

148. Благова О.В. Миокардит при аритмогенной дисплазии / кардиомиопатии правого желудочка : частота , роль в формировании фенотипа , результаты лечения / Благова О.В., Лутохина Ю.А., Коган Е.А., Недоступ А.В., Зайденов В.А., Куприянова А.Г., Кадочникова В.В., Донников А.Е., Шестак А.Г., Заклязьминская Е.В. – 2020. – С.59–72.

149. Marcus F.I. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Marcus F.I., McKenna W.J., Sherrill D., Basso C., Bauce B., Bluemke D.A., Calkins H., Corrado D., Cox M.G.P.J., Daubert J.P., Fontaine G., Gear K., Hauer R., Nava A., Picard M.H., Protonotarios N., Saffitz J.E., Sanborn D.M.Y., Steinberg J.S., Tandri H., Thiene G., Towbin J.A., Tsatsopoulou A., Wichter T., Zareba W. // European Heart Journal – 2010. – Т. 31 – № 7 – С.806–814.

150. Corrado D. Diagnosis of arrhythmogenic cardiomyopathy: The Padua criteria / Corrado D., Perazzolo Marra M., Zorzi A., Beffagna G., Cipriani A., Lazzari M. De, Migliore F., Pilichou K., Rampazzo A., Rigato I., Rizzo S., Thiene G., Anastasakis A., Asimaki A., Bucciarelli-Ducci C., Haugaa K.H., Marchlinski F.E., Mazzanti A., McKenna W.J., Pantazis A., Pelliccia A., Schmier C., Sharma S., Wichter T., Bauce B., Basso C. // International Journal of Cardiology – 2020. – Т. 319 – С.106–114.

151. Corrado D. Arrhythmogenic cardiomyopathy / Corrado D., Basso C., Judge D.P. // Circulation Research – 2017. – Т. 121 – № 7 – С.785–802.

152. Pérez Riera A.R. Is there an overlap between Brugada syndrome and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia? / Pérez Riera A.R., Antzelevitch C., Schapacknik E., Dubner S., Ferreira C. // Journal of Electrocardiology – 2005. – Т. 38 – № 3 – С.260–263.

153. Erkapic D. Electrical storm in a patient with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and SCN5A mutation / Erkapic D., Neumann T., Schmitt J., Sperzel J., Berkowitsch A., Kuniss M., Hamm C.W., Pitschner H.F. // Europace – 2008. – Т. 10 – № 7 – С.884–887.

154. McNair W.P. SCN5A mutation associated with dilated cardiomyopathy, conduction disorder, and arrhythmia / McNair W.P., Ku L., Taylor M.R.G., Fain P.R., Dao D., Wolfel E., Mestroni L. // Circulation – 2004. – Т. 110 – № 15 – С.2163–2167.

155. Garcia-Pavia P. Desmosomal protein gene mutations in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy undergoing cardiac transplantation: A clinicopathological study / Garcia-Pavia P., Syrris P., Salas C., Evans A., Mirelis J.G., Cobo-Marcos M., Vilches C., Bornstein B., Segovia J., Alonso-Pulpon L., Elliott P.M. // *Heart* – 2011. – T. 97 – № 21 – C.1744–1752.
156. Burke M.A. Clinical and Mechanistic Insights Into the Genetics of Cardiomyopathy / Burke M.A., Cook S.A., Seidman J.G., Seidman C.E. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2016. – T. 68 – № 25 – C.2871–2886.
157. Haas J. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy / Haas J., Frese K.S., Peil B., Meder B. // *European Heart Journal* – 2015. – T. 36 – № 18 – C.1123–1135.
158. Bainbridge M.N. Identification of established arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy mutation in a patient with the contrasting phenotype of hypertrophic cardiomyopathy / Bainbridge M.N., Li L., Tan Y., Cheong B.Y., Marian A.J. // *BMC Medical Genetics* – 2017. – T. 18 – № 1 – C.1–7.
159. Oechslin E.N. Long-term follow-up of 34 adults with isolated left ventricular noncompaction: A distinct cardiomyopathy with poor prognosis / Oechslin E.N., Attenhofer Jost C.H., Rojas J.R., Kaufmann P.A., Jenni R. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2000. – T. 36 – № 2 – C.493–500.
160. Rezaei H. Harnessing CRISPR/Cas9 technology in cardiovascular disease / Rezaei H., khadempour S., Farahani N., Hosseingholi E.Z., hayat S.M.G., Sathyapalan T., Sahebkar A. hossein // *Trends in Cardiovascular Medicine* – 2020. – T. 30 – № 2 – C.93–101.
161. Maruyama T. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining / Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. // *Nature Biotechnology* – 2015. – T. 33 – № 5 – C.538–542.
162. Ma H. Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos / Ma H., Marti-Gutierrez N., Park S.W., Wu J., Lee Y., Suzuki K., Koski A., Ji D., Hayama T., Ahmed R., Darby H., Dyken C. Van, Li Y., Kang E., Park A.R., Kim D., Kim S.T., Gong J., Gu Y., Xu X., Battaglia D., Krieg S.A., Lee D.M., Wu D.H., Wolf D.P., Heitner S.B., Belmonte J.C.I., Amato P., Kim J.S., Kaul S., Mitalipov S. // *Nature* – 2017. – T. 548 – № 7668 – C.413–419.
163. Mendell J.R. Duchenne muscular dystrophy: CRISPR/Cas9 treatment / Mendell J.R., Rodino-Klapac L.R. // *Cell Research* – 2016. – T. 26 – № 5 – C.513–514.
164. Wang H. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering / Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. // *Cell* – 2013. – T. 153 – № 4 – C.910–918.
165. Limpitikul W.B. A Precision Medicine Approach to the Rescue of Function on Malignant

- Calmodulinopathic Long-QT Syndrome / Limpitikul W.B., Dick I.E., Tester D.J., Boczek N.J., Limphong P., Yang W., Choi M.H., Babich J., Disilvestre D., Kanter R.J., Tomaselli G.F., Ackerman M.J., Yue D.T. // *Circulation Research* – 2017. – Т. 120 – № 1 – С.39–48.
166. Ding S. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice / Ding S., Wu X., Li G., Han M., Zhuang Y., Xu T. // *Cell* – 2005. – Т. 122 – № 3 – С.473–483.
167. Kondrashov A. Simplified Footprint-Free Cas9/CRISPR Editing of Cardiac-Associated Genes in Human Pluripotent Stem Cells / Kondrashov A., Hoang M.D., Smith J.G.W., Bhagwan J.R., Duncan G., Mosqueira D., Munoz M.B., Vo N.T.N., Denning C. // *Stem Cells and Development* – 2018. – Т. 27 – № 6 – С.391–404.
168. Кочергин-Никитский К.С. Использование CRISPR/Cas9 для нокаута аллелей гена DES, несущих гетерозиготные gain-of-function мутации, связанные с развитием десминопатии / Кочергин-Никитский К.С., Лавров А.В., Заключьминская Е.В., Смирнихина С.А. // *Медицинская Генетика* – 2021. – Т. 7 – № 20 – С.37–44.
169. Cox D.B.T. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges / Cox D.B.T., Platt R.J., Zhang F. // *Nature Medicine* – 2015. – Т. 21 – № 2 – С.121–131.
170. Karakikes I. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy / Karakikes I., Stillitano F., Nonnenmacher M., Tzimas C., Sanoudou D., Termglinchan V., Kong C.W., Rushing S., Hansen J., Ceholski D., Kolokathis F., Kremastinos D., Katoulis A., Ren L., Cohen N., Gho J.M.I.H., Tsiapras D., Vink A., Wu J.C., Asselbergs F.W., Li R.A., Hulot J.S., Kranias E.G., Hajjar R.J. // *Nature Communications* – 2015. – Т. 6 – № 6955.
171. Porcari A. Current diagnostic strategies for dilated cardiomyopathy: a comparison of imaging techniques / Porcari A., Angelis G. De, Romani S., Paldino A., Artico J., Cannatà A., Gentile P., Pinamonti B., Merlo M., Sinagra G. // *Expert Review of Cardiovascular Therapy* – 2019. – Т. 17 – № 1 – С.53–63.
172. Sambrook J. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform / Sambrook J., Russell D.W. // *CSH Protoc.* – 2006. – Т. 1 – № pdb.prot4455.
173. Marshall O.J. PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR / Marshall O.J. // *Bioinformatics* – 2004. – Т. 20 – № 15 – С.2471–2472.
174. Ye J. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction / Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T.L. // *BMC Bioinformatics* – 2012. – Т. 13 – № 134.
175. Robinson J.T. Integrative Genome Viewer / Robinson J.T., Thorvaldsdóttir H., Winckler W., Guttman M., Lander E.S., Getz G., Mesirov J.P. // *Nature Biotechnology* – 2011. – Т. 29 – № 1 –

C.24–6.

176. Abou Tayoun A.N. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion / Abou Tayoun A.N., Pesaran T., DiStefano M.T., Oza A., Rehm H.L., Biesecker L.G., Harrison S.M. // *Human Mutation* – 2018. – T. 39 – № 11 – C.1517–1524.
177. Kelly M.A. Adaptation and validation of the ACMG/AMP variant classification framework for MYH7-associated inherited cardiomyopathies: Recommendations by ClinGen's Inherited Cardiomyopathy Expert Panel / Kelly M.A., Caleshu C., Morales A., Buchan J., Wolf Z., Harrison S.M., Cook S., Dillon M.W., Garcia J., Haverfield E., Jongbloed J.D.H., Macaya D., Manrai A., Orland K., Richard G., Spoonamore K., Thomas M., Thomson K., Vincent L.M., Walsh R., Watkins H., Whiffin N., Ingles J., Tintelen J.P. Van, Semsarian C., Ware J.S., Hershberger R., Funke B., Berg J., Milko L., Rivera Munoz E.A., Ackerman M., Care M., DeBacker J., Deitz H., Gollob M., Knowles J., Loeys B., McKenna B., Milewicz D., Novelli V., Sturm A., Wilde A. // *Genetics in Medicine* – 2018. – T. 20 – № 3 – C.351–359.
178. Karczewski K.J. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans / Karczewski K.J., Francioli L.C., Tiao G., MacArthur D.G. // *Nature* – 2020. – T. 581 – № 7809 – C.434–443.
179. Al-Jassar C. Mechanistic basis of desmosome-targeted diseases / Al-Jassar C., Bikker H., Overduin M., Chidgey M. // *Journal of Molecular Biology* – 2013. – T. 425 – № 21 – C.4006–4022.
180. Dalal D. Clinical features of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/ cardiomyopathy associated with mutations in plakophilin-2 // *Circulation*. – 2006. – T. 113. – № 13. – 1641–1649c.
181. Haan A.D. Den NIH Public Access / Haan A.D. Den, Tan B.Y., Zikusoka M.N., Lladó I., Jain R., Daly A., Tichnell C., James C., Amat-alarcon N., Abraham T., Russell S.D., David A., Calkins H., Dalal D., Judge D.P. – 2010. – T. 2 – № 5 – C.428–435.
182. Barahona-Dussault C. Role of genetic testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Barahona-Dussault C., Benito B., Campuzano O., Iglesias A., Leung T.L., Robb L., Talajic M., Brugada R. // *Clinical Genetics* – 2010. – T. 77 – № 1 – C.37–48.
183. Adler A. Patient outcomes from a specialized inherited arrhythmia clinic / Adler A., Sadek M.M., Chan A.Y.M., Dell E., Rutberg J., Davis D., Green M.S., Spears D.A., Gollob M.H. // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* – 2016. – T. 9 – № 1 – C.e003440.
184. Awad M.M. DSG2 mutations contribute to arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy / Awad M.M., Dalal D., Cho E., Amat-Alarcon N., James C., Tichnell C., Tucker A., Russell S.D., Bluemke D.A., Dietz H.C., Calkins H., Judge D.P. // *American Journal of Human Genetics* – 2006. – T. 79 – № 1 – C.136–142.
185. Gaido L. Phenotypic expression of ARVC: How 12 lead ECG can predict left or right ventricle

- involvement. A familiar case series and a review of literature / Gaido L., Battaglia A., Matta M., Giustetto C., Frea S., Imazio M., Richiardi E., Garberoglio L., Gaita F. // *International Journal of Cardiology* – 2017. – Т. 236 – С.328–334.
186. Gandjbakhch E. Sporadic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia due to a de novo mutation / Gandjbakhch E., Fressart V., Bertaux G., Faivre L., Simon F., Frank R., Fontaine G., Villard E., Coirault C., Hainque B., Charron P. // *Europace* – 2009. – Т. 11 – № 3 – С.379–381.
187. Walsh R. Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples / Walsh R., Thomson K.L., Ware J.S., Funke B.H., Woodley J., McGuire K.J., Mazzarotto F., Blair E., Seller A., Taylor J.C., Minikel E. V., MacArthur D.G., Farrall M., Cook S.A., Watkins H. // *Genetics in Medicine* – 2017. – Т. 19 – № 2 – С.192–203.
188. Nakajima T. Compound and digenic heterozygosity in desmosome genes as a cause of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy in Japanese patients / Nakajima T., Kaneko Y., Irie T., Takahashi R., Kato T., Iijima T., Iso T., Kurabayashi M. // *Circulation Journal* – 2012. – Т. 76 – № 3 – С.737–743.
189. Kapplinger J.D. Spectrum and prevalence of mutations from the first 2,500 consecutive unrelated patients referred for the FAMILION® long QT syndrome genetic test / Kapplinger J.D., Tester D.J., Salisbury B.A., Carr J.L., Harris-kerr C., Pollevick G.D., Wilde A.A.M. // *Heart Rhythm* – 2011. – Т. 6 – № 9 – С.1297–1303.
190. Rampersaud E. Rare variant mutations identified in pediatric patients with dilated cardiomyopathy / Rampersaud E., Siegfried J.D., Norton N., Li D., Martin E., Hershberger R.E. // *Progress in Pediatric Cardiology* – 2011. – Т. 31 – № 1 – С.39–47.
191. Laurent G. Multifocal Ectopic Purkinje-Related Premature Contractions / Laurent G, Saal S, Amarouch MY, Béziau DM, Marsman RF, Faivre L, Barc J, Dina C, Bertaux G, Barthez O, Thauvin-Robinet C, Charron P, Fressart V, Maltret A, Villain E, Baron E, Mérot J, Turpault R, Coudière Y, Charpentier F, Schott JJ, Loussouarn G, Wilde A., Probst V. // *J Am Coll Cardiol.* – 2012. – Т. 60(2) – С.144–56.
192. Mann S.A. R222Q SCN5A mutation is associated with reversible ventricular ectopy and dilated cardiomyopathy // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2012. – Т. 60. – № 16. – 1566–1573с.
193. Ehlermann P. Adverse events in families with hypertrophic or dilated cardiomyopathy and mutations in the MYBPC3 gene / Ehlermann P., Weichenhan D., Zehelein J., Steen H., Pribe R., Zeller R., Lehrke S., Zugck C., Ivandic B.T., Katus H.A. // *BMC Medical Genetics* – 2008. – Т. 9 – С.1–11.
194. Комиссарова С.М. Особенности клинических проявлений гипертрофической кардиомиопатии у пациентов с различными мутациями в генах саркомеров / Комиссарова С.М., Чакова Н.Н., Ниязова С.С., Казаков С.В., Жукова Е.А., Александров А.В., Глотов О.С., Глотов

A.C. – 2016. – Т. 1 – № 129 – С.20–25.

195. Erdmann J. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy / Erdmann J., Raible J., Maki-Abadi J., Hummel M., Hammann J., Wollnik B., Frantz E., Fleck E., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2001. – Т. 38 – № 2 – С.322–330.

196. Velzen H.G. Van Clinical Characteristics and Long-Term Outcome of Hypertrophic Cardiomyopathy in Individuals with a MYBPC3 (Myosin-Binding Protein C) Founder Mutation / Velzen H.G. Van, Schinkel A.F.L., Oldenburg R.A., Slegtenhorst M.A. Van, Frohn-Mulder I.M.E., Velden J. Van Der, Michels M. // *Circulation: Cardiovascular Genetics* – 2017. – Т. 10 – № 4 – С.1–8.

197. Поляк М.Е. Спектр мутаций в гене MYBPC3 у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией / Поляк М.Е., Ховалыг А.Б., Букаева А.А., Дземешкевич С.Л., Заклязьминская Е.В. // *Медицинская Генетика* – 2016. – Т. 15(8) – С.26–29.

198. Brun F. FLNC truncations cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy // *J. Med. Genet.* – 2020. – Т. 57. – № 4. – 254–257с.

199. Pilichou K. Large genomic rearrangements of desmosomal genes in Italian arrhythmogenic cardiomyopathy patients // *Circ. Arrhythmia Electrophysiol.* – 2017. – Т. 10. – № 10.

200. Haugaa KH Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy AKA Arrhythmogenic Right Ventricular Dysplasia / Haugaa KH, Haland TF, Leren IS, Saberniak J, Edvardsen T // *Europace* – 2016. – Т. 18 – С.965–972.

201. Baturova M.A. Atrial fibrillation as a clinical characteristic of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy: Experience from the Nordic ARVC Registry / Baturova M.A., Haugaa K.H., Jensen H.K., Svensson A., Gilljam T., Bundgaard H., Madsen T., Hansen J., Chivulescu M., Christiansen M.K., Carlson J., Edvardsen T., Svendsen J.H., Platonov P.G. // *International Journal of Cardiology* – 2020. – Т. 298 – С.39–43.

202. Cipriani A. Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy: Characterization of Left Ventricular Phenotype and Differential Diagnosis With Dilated Cardiomyopathy / Cipriani A., Bauce B., Lazzari M. De, Rigato I., Bariani R., Meneghin S., Pilichou K., Motta R., Aliberti C., Thiene G., McKenna W.J., Zorzi A., Iliceto S., Basso C., Perazzolo Marra M., Corrado D. // *Journal of the American Heart Association* – 2020. – Т. 9 – № 5 – С.e014628.

203. Taylor M. Genetic Variation in Titin in ARVC-Overlap Syndromes / Taylor M., Graw S., Sinagra G., Barnes C., Slavov D., Brun F., Pinamonti B., Ernesto E., Sauer W., Pyxaras S., Anderson B. – 2012. – Т. 124 – № 8 – С.876–885.

204. Spezzacatene A. Arrhythmogenic phenotype in dilated cardiomyopathy: Natural history and predictors of life-threatening arrhythmias / Spezzacatene A., Sinagra G., Merlo M., Barbati G., Graw

- S.L., Brun F., Slavov D., Lenarda A. Di, Salcedo E.E., Towbin J.A., Saffitz J.E., Marcus F.I., Zareba W., Taylor M.R.G., Mestroni L. // *Journal of the American Heart Association* – 2015. – T. 4 – № 10 – C.1–9.
205. Lakdawala N.K. Dilated cardiomyopathy / Lakdawala N.K., Winterfield J.R., Funke B.H. // *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* – 2013. – T. 6 – № 1 – C.228–237.
206. Zucca S. Analysis of amplicon-based NGS data from neurological disease gene panels: A new method for allele drop-out management / Zucca S., Villaraggia M., Gagliardi S., Grieco G.S., Valente M., Cereda C., Magni P. // *BMC Bioinformatics* – 2016. – T. 17 – № Suppl 12.
207. Jenni R. Echocardiographic and pathoanatomical characteristics of isolated left ventricular non-compaction: a step towards classification as a distinct cardiomyopathy / Jenni R., Oechslin E., Schneider J., Jost C.A., Kaufmann P.A. – 2001. – T. 86 – C.666–671.
208. DeWitt E.S. Phenotypic Manifestations of Arrhythmogenic Cardiomyopathy in Children and Adolescents / DeWitt E.S., Chandler S.F., Hyland R.J., Beausejour Ladouceur V., Blume E.D., VanderPluym C., Powell A.J., Fynn-Thompson F., Roberts A.E., Sanders S.P., Bezzerides V., Lakdawala N.K., MacRae C.A., Abrams D.J. // *Journal of the American College of Cardiology* – 2019. – T. 74 – № 3 – C.346–358.
209. Venselaar H. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces / Venselaar H., Beek T.A.H. te, Kuipers R.K.P., Hekkelman M.L., Vriend G. // *BMC Bioinformatics* – 2010. – T. 11 – № 1 – C.548.
210. Rigato I. Compound and digenic heterozygosity predicts lifetime arrhythmic outcome and sudden cardiac death in desmosomal gene-related arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy / Rigato I., Bauce B., Rampazzo A., Zorzi A., Pilichou K., Mazzotti E., Migliore F., Marra M.P., Lorenzon A., Bortoli M. De, Calore M., Nava A., Daliento L., Gregori D., Iliceto S., Thiene G., Basso C., Corrado D. // *Circulation: Cardiovascular Genetics* – 2013. – T. 6 – № 6 – C.533–542.
211. Bauce B. Multiple mutations in desmosomal proteins encoding genes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia / Bauce B., Nava A., Beffagna G., Basso C., Lorenzon A., Smaniotta G., Bortoli M. De, Rigato I., Mazzotti E., Steriotis A., Marra M.P., Towbin J.A., Thiene G., Danieli G.A., Rampazzo A. // *Heart Rhythm* – 2010. – T. 7 – № 1 – C.22–29.
212. Bombard Y. The Responsibility to Recontact Research Participants after Reinterpretation of Genetic and Genomic Research Results / Bombard Y., Brothers K.B., Fitzgerald-Butt S., Garrison N.A., Jamal L., James C.A., Jarvik G.P., McCormick J.B., Nelson T.N., Ormond K.E., Rehm H.L., Richer J., Souzeau E., Vassy J.L., Wagner J.K., Levy H.P. // *American Journal of Human Genetics* – 2019. – T. 104 – № 4 – C.578–595.
213. Walsh R. Enhancing rare variant interpretation in inherited arrhythmias through quantitative

- analysis of consortium disease cohorts and population controls / Walsh R., Lahrouchi N., Tadros R., Bezzina C.R. // *Genetics in Medicine* – 2021. – T. 23 – № 1 – C.47–58.
214. Haywood A.F.M. Recurrent missense mutations in TMEM43 (ARVD5) due to founder effects cause arrhythmogenic cardiomyopathies in the UK and Canada / Haywood A.F.M., Merner N.D., Hodgkinson K.A., Houston J., Syrris P., Booth V., Connors S., Pantazis A., Quarta G., Elliott P., McKenna W., Young T.L. // *European Heart Journal* – 2013. – T. 34 – № 13 – C.1002–1011.
215. Christensen A.H. Plakophilin-2 c.419C>T and risk of heart failure and arrhythmias in the general population / Christensen A.H., Kamstrup P.R., Gandjbakhch E., Benn M., Jensen J.S., Bundgaard H., Villard E., Tybjaerg-Hansen A. // *European Journal of Human Genetics* – 2016. – T. 24 – № 5 – C.732–738.
216. Walsh R. Quantitative approaches to variant classification increase the yield and precision of genetic testing in Mendelian diseases: The case of hypertrophic cardiomyopathy // *Genome Med.* – 2019. – T. 11. – № 1.
217. Girolami F. Novel α -actinin 2 variant associated with familial hypertrophic cardiomyopathy and juvenile atrial arrhythmias: A massively parallel sequencing study / Girolami F., Iascone M., Tomberli B., Bardi S., Benelli M., Marseglia G., Pescucci C., Pezzoli L., Sana M.E., Basso C., Marziliano N., Merlini P.A., Fornaro A., Cecchi F., Torricelli F., Olivetto I. // *Circulation: Cardiovascular Genetics* – 2014. – T. 7 – № 6 – C.741–750.

Популяционные генетические варианты, выявленные на панели I «Гены, кодирующие десмосомные и связанные с ними белки», не имеющие явного клинического значения

№ п/п	Хромосомная координата по hg19	Ген	Вариант	Идентификатор dbSNP	AF
1	chr12:32948934	<i>PKP2</i>		rs12228193	0.287
2	chr12:32949029	<i>PKP2</i>		rs149968852	0.285
3	chr12:32993822	<i>PKP2</i>		rs73303628	0.091
4	chr12:32945721	<i>PKP2</i>		rs6488091	0.499
5	chr12:32945495	<i>PKP2</i>		rs7956824	0.498
6	chr12:32945486	<i>PKP2</i>		rs113493546	0.03907
7	chr12:33049457	<i>PKP2</i>	c.209G>T	rs75909145	0.02089
8	chr18:29101230	<i>DSG2</i>		rs374076594, rs55657337	0.123
9	chr18:29104264	<i>DSG2</i>		rs2848664	0.206
10	chr18:29104698	<i>DSG2</i>	c.861C>T	rs2230233	0.488
11	chr18:29116462	<i>DSG2</i>		rs2276150	0.128
12	chr18:29125854	<i>DSG2</i>	c.2505A>G	rs1042769	0.187
13	chr18:29126670	<i>DSG2</i>	c.3321T>C	rs1791235	0.457
14	chr18:28659724	<i>DSC2</i>		rs1658128	0.003
15	chr18:28666526	<i>DSC2</i>		rs111347888, rs35717505	0.003
16	chr18:28673565	<i>DSC2</i>	c.111A>G	rs12954874	0.116
17	chr6:7555854	<i>DSP</i>		rs9392904	0.17
18	chr6:7558318	<i>DSP</i>		rs10484326	0.178
19	chr6:7566386	<i>DSP</i>		rs2842683	0.494
20	chr6:7566415	<i>DSP</i>		rs2757633	0.169
21	chr6:7567970	<i>DSP</i>		rs2076296	0.21
22	chr6:7572262	<i>DSP</i>	c.2091A>G	rs2076304	0.209

23	chr6:7574805	<i>DSP</i>		rs2259208	0.323
24	chr6:7576368	<i>DSP</i>		rs2806232	0.229
25	chr6:7577260	<i>DSP</i>	c.2862C>T	rs2064217	0.261
26	chr6:7579412	<i>DSP</i>		rs2806225	0.288
27	chr6:7581636	<i>DSP</i>	c.5213G>A	rs6929069	0.222
28	chr6:7584617	<i>DSP</i>	c.7122C>T	rs2076300	0.23
29	chr6:7563983	<i>DSP</i>	c.741G>T	rs2806234	0.9993
30	chr6:7578823	<i>DSP</i>		rs2842691	0.7787
31	chr6:7576527	<i>DSP</i>	c.2631G>A	rs1016835	0.7702
32	chr6:7578819	<i>DSP</i>		rs2806229	0.7714
33	chr6:7585967	<i>DSP</i>	c.8472G>C	rs2744380	0.7095
34	chr6:7572026	<i>DSP</i>		rs2076303	0.4561
35	chr6:7542148	<i>DSP</i>		rs17133512	0.1677
36	chr6:7580958	<i>DSP</i>	c.4535A>G	rs2076299	0.1194
37	chr6:7571874	<i>DSP</i>		rs926411	0.8131
38	chr6:7574852	<i>DSP</i>		rs2295859	0.05225
39	chr6:7585670	<i>DSP</i>		rs11558731	0.04553
40	chr6:7578189	<i>DSP</i>		rs6942260	0.2601
41	chr17:39923614	<i>JUP</i>		rs12942034	0.271
42	chr17:39923960	<i>JUP</i>		rs9914693	0.315
43	chr17:39925925	<i>JUP</i>	c.213T>C	rs7405731	0.294
44	chr17:39912145	<i>JUP</i>	c.2089A>T	rs1126821	0.428
45	chr17:39913645	<i>JUP</i>		rs7216034	0.303
46	chr17:39912259	<i>JUP</i>		rs141010071, rs61064630	0.354
47	chr17:39914070	<i>JUP</i>		rs8067890	0.368
48	chr1:156096873	<i>LMNA</i>		rs622834	0.111
49	chr1:156096919	<i>LMNA</i>		rs623189	0.085
50	chr1:156105028	<i>LMNA</i>	c.861T>C	rs538089	0.161

51	chr1:156105609	<i>LMNA</i>		rs646840	0.164
52	chr1:156105928	<i>LMNA</i>		rs534807	0.162
53	chr1:156106185	<i>LMNA</i>	c.1338T>C	rs505058	0.214
54	chr1:156106863	<i>LMNA</i>		rs553016	0.151
55	chr1:156108976	<i>LMNA</i>		rs7339	0.1661
56	chr1:156104392	<i>LMNA</i>		rs11264443	0.06637
57	chr1:156104375	<i>LMNA</i>		rs11264442	0.06718
58	chr1:156107534	<i>LMNA</i>		rs4641	0.2515
59	chr2:220283259	<i>DES</i>	c.75A>G	rs1318299	0.089
60	chr2:220283277	<i>DES</i>	c.93T>C	rs2017800	0.101
61	chr2:220284779	<i>DES</i>		rs12991025	0.456
62	chr2:220283826	<i>DES</i>		rs907677	0.9999
63	chr2:220284717	<i>DES</i>		rs2666106	0.9933
64	chr2:220285309	<i>DES</i>	c.828C>T	rs1058261	0.3341
65	chr2:220285666	<i>DES</i>	c.1014G>C	rs12920	0.3341
66	chr2:220286142	<i>DES</i>	c.1104G>A	rs1058284	0.3344
67	chr3:14174146	<i>TMEM43</i>		rs4685075	0.447
68	chr3:14174427	<i>TMEM43</i>	c.504A>T	rs4685076	0.331
69	chr3:14175262	<i>TMEM43</i>	c.536T>C	rs2340917	0.456
70	chr3:14176446	<i>TMEM43</i>		rs6766740	0.328
71	chr3:14177194	<i>TMEM43</i>		rs2607765	0.279
72	chr3:14177251	<i>TMEM43</i>		rs3796311	0.179
73	chr3:14180552	<i>TMEM43</i>		rs2607767	0.315
74	chr3:14183410	<i>TMEM43</i>		rs1043943	0.336
75	chr3:14175149	<i>TMEM43</i>		rs2733585	0.07471
76	chr3:14180633	<i>TMEM43</i>		rs2731320	0.1591
77	chr14:76429555	<i>TGFB3</i>		rs3917201, rs45494000	0.355

78	chr14:76432136	<i>TGFB3</i>		rs3917187	0.399
79	chr14:76429868	<i>TGFB3</i>		rs3917200	0.09624
80	chr11:111781047	<i>CRYAB</i>		rs11603779	0.2723
81	chr3:38601556	<i>SCN5A</i>		rs6799868	0.435
82	chr3:38645420	<i>SCN5A</i>	c.1673A>G	rs1805124	0.206
83	chr3:38646423	<i>SCN5A</i>		rs7428779	0.162
84	chr3:38647642	<i>SCN5A</i>		rs41312433	0.146
85	chr3:38648062	<i>SCN5A</i>		rs6599222	0.173
86	chr3:38655643	<i>SCN5A</i>		rs9856587	0.207
87	chr3:38674712	<i>SCN5A</i>	c.87A>G	rs6599230	0.233
88	chr3:38622467	<i>SCN5A</i>	c.3183A>G	rs7430407	0.9127
89	chr3:38591689	<i>SCN5A</i>		rs7429945	0.4462
90	chr3:38592406	<i>SCN5A</i>	c.5295T>C	rs1805126	0.3934
91	chr3:38598669	<i>SCN5A</i>		rs41312393	0.09845
92	chr3:38674475	<i>SCN5A</i>		rs41261744	0.03508
93	chr3:38590275	<i>SCN5A</i>	c.7426T>C	rs41315485	0.2158
94	chr3:38597867	<i>SCN5A</i>		rs41315507	0.09848
95	chr10:88451869	<i>LDB3</i>		rs3740346	0.256
96	chr10:88469587	<i>LDB3</i>		rs3740347	0.357
97	chr10:88428158	<i>LDB3</i>		rs2803555	0.191
98	chr10:88428167	<i>LDB3</i>		rs11812601	0.354
99	chr10:88428335	<i>LDB3</i>		rs2803558	0.265
100	chr10:88445385	<i>LDB3</i>		rs3740345	0.399
101	chr10:88493858	<i>LDB3</i>		rs45602332	0.026
102	chr10:88494633	<i>LDB3</i>		rs35222021	0.295
103	chr10:88466465	<i>LDB3</i>	c.1074C>T	rs45459491	0.018

104	chr10:88494364	<i>LDB3</i>		rs34218952	0.295
105	chr10:88494531	<i>LDB3</i>		rs45516103	0.018
106	chr10:67680578	<i>CTNNA3</i>		rs7907928	0.458
107	chr10:68040325	<i>CTNNA3</i>	c.1787G>A	rs4548513	0.472
108	chr10:68139142	<i>CTNNA3</i>		rs12761828	0.095
109	chr10:69281701	<i>CTNNA3</i>	c.478T>A	rs61749223	0.011
110	chr10:69281732	<i>CTNNA3</i>		rs7903421	0.046
111	chr10:69299446	<i>CTNNA3</i>		rs1909654	0.164
112	chr10:69366602	<i>CTNNA3</i>		rs3750863	0.49
113	chr10:67726514	<i>CTNNA3</i>		rs2105702	0.3470
114	chr10:69281585	<i>CTNNA3</i>		rs10997691	0.1622
115	chr7:128470838	<i>FLNC</i>	c.147C>T	rs3734972	0.116
116	chr7:128477472	<i>FLNC</i>	c.720T>C	rs2291560	0.112
117	chr7:128477547	<i>FLNC</i>	c.795T>C	rs2291561	0.111
118	chr7:128480791	<i>FLNC</i>		rs2291564	0.268
119	chr7:128483227	<i>FLNC</i>		rs2291567	0.335
120	chr7:128484816	<i>FLNC</i>	c.3297A>G	rs3734973	0.351
121	chr7:128486363	<i>FLNC</i>	c.3973C>T	rs34373805	0.333
122	chr7:128488734	<i>FLNC</i>	c.4700G>A	rs2291569	0.070
123	chr7:128490553	<i>FLNC</i>		rs13227216	0.367
124	chr7:128487866	<i>FLNC</i>		rs2249128	0.9972
125	chr7:128491603	<i>FLNC</i>		rs3816884	0.1314
126	chr7:128482440	<i>FLNC</i>		rs2291566	0.1309
127	chr7:128481196	<i>FLNC</i>		rs2291565	0.1248
128	chr7:128478103	<i>FLNC</i>	c.1032C>T	rs2291562	0.09899
129	chr7:128477620	<i>FLNC</i>		rs55907818	0.07939

130	chr7:128480666	<i>FLNC</i>		rs76046880	0.03164
131	chr7: 128486446	<i>FLNC</i>	c.4056C>T	rs75770585	0.08931
132	chr7: 128486091	<i>FLNC</i>	c.3838C>T	rs34180031	0.03329
133	chr7: 128488800	<i>FLNC</i>		rs74811088	0.03146
134	chr7: 128482835	<i>FLNC</i>		rs78086167	0.03157
135	chr7: 128482806	<i>FLNC</i>		rs111958241	0.03154

Популяционные генетические варианты, выявленные на панели II «Гены, кодирующие саркомерные и связанные с ними белки», не имеющие явного клинического значения

№ п/п	Хромосомная координата по hg19	Ген	Вариант	Идентификатор dbSNP	AF
1	chr14:23884889	<i>MYH7</i>	c.5106G>A	rs3729830	0.12
2	chr14:23892888	<i>MYH7</i>	c.2967T>C	rs7157716	0.356
3	chr14:23898994	<i>MYH7</i>	c.1128C>T	rs2231126	0.144
4	chr14:23900794	<i>MYH7</i>	c.732C>T	rs2069542	0.225
5	chr14:23902974	<i>MYH7</i>		rs3729992	0.047
6	chr14:23903380	<i>MYH7</i>		rs2239578	0.474
7	chr14:23881950	<i>MYH7</i>		rs17794387	0.052
8	chr14:23899060	<i>MYH7</i>	c.1062C>T	rs735712	0.051
9	chr14:23902753	<i>MYH7</i>	c.189C>T	rs2069540	0.471
10	chr14:23883184	<i>MYH7</i>		rs3729833	0.139
11	chr14:23886264	<i>MYH7</i>		rs3729825	0.138
12	chr14:23899027	<i>MYH7</i>	c.1095G>A	rs735711	0.092
13	chr14:23888665	<i>MYH7</i>		rs2277475	0.3175
14	chr14:23887645	<i>MYH7</i>		rs7159367	0.3259
15	chr14:23899725	<i>MYH7</i>		rs3729810	0.1038
16	chr14:23882144	<i>MYH7</i>		rs2284651	0.4373
17	chr14:23888323	<i>MYH7</i>		rs34598192	0.4088
18	chr14:23895083	<i>MYH7</i>		rs3729818	0.2500
19	chr14:23884137	<i>MYH7</i>		rs3729832	0.1382
20	chr11:47361084	<i>MYBPC3</i>		rs2856653	0.256
21	chr11:47365199	<i>MYBPC3</i>		rs2856650	0.254

22	chr11:47370041	<i>MYBPC3</i>	c.706A>G	rs3729989	0.087
23	chr11:47371442	<i>MYBPC3</i>	c.537C>T	rs11570051	0.023
24	chr11:47364762	<i>MYBPC3</i>		rs896818	0.9886
25	chr11:47371484	<i>MYBPC3</i>		rs11570050	0.6579
26	chr11:47354787	<i>MYBPC3</i>		rs1052373	0.4008
27	chr11:47354068	<i>MYBPC3</i>		rs3729802	0.2629
28	chr11:47365014	<i>MYBPC3</i>		rs11570078	0.09721
29	chr11:47369443	<i>MYBPC3</i>	c.786C>T	rs11570058	0.08998
30	chr11:47354905	<i>MYBPC3</i>		rs11570115	0.07200
31	chr11:47360053	<i>MYBPC3</i>		rs3729948	0.04888
32	chr11:47371598	<i>MYBPC3</i>	c.472G>A	rs3729986	0.06624
33	chr11:47353498	<i>MYBPC3</i>		rs2290146	0.2867
34	chr11:47372749	<i>MYBPC3</i>		rs3729985	0.04371
35	chr1:201334382	<i>TNNT2</i>	c.348C>T	rs3729547	0.328
36	chr1:201338896	<i>TNNT2</i>		rs10920184	0.456
37	chr1:201341341	<i>TNNT2</i>		rs868407	0.246
38	chr1:201328272	<i>TNNT2</i>		rs3729998	0.016
39	chr1:201336984	<i>TNNT2</i>		rs3729843	0.301
40	chr1:201338553	<i>TNNT2</i>		rs10800776	0.288
41	chr1:201328705	<i>TNNT2</i>		rs45576635	0.016
42	chr1:201334795	<i>TNNT2</i>	c.237G>A	rs3729845	0.071
43	chr1:201331554	<i>TNNT2</i>		rs1104859	0.7346
44	chr1:201328824	<i>TNNT2</i>		rs2275863	0.1638
45	chr1:201335899	<i>TNNT2</i>		rs1573230	0.9813
46	chr1:201337486	<i>TNNT2</i>		rs3753999	0.06884
47	chr19:55665410	<i>TNNI3</i>	c.536G>A	rs3729841	0.042

48	chr19:55668397	<i>TNNI3</i>		rs3729837	0.042
49	chr19:55668509	<i>TNNI3</i>		rs3729836	0.394
50	chr19:55665584	<i>TNNI3</i>		rs7252610	1.000
51	chr15:63351840	<i>TPMI</i>	c.453C>A	rs1071646	0.303
52	chr15:63363654	<i>TPMI</i>		rs8519	0.307
53	chr15:63363901	<i>TPMI</i>		rs6738	0.308
54	chr15:63336099	<i>TPMI</i>		rs62013181	0.038
55	chr15:63363631	<i>TPMI</i>		rs1050255	0.112
56	chr15:63363737	<i>TPMI</i>		rs707602	0.094
57	chr15:63364098	<i>TPMI</i>		rs7178040	0.105
58	chr15:63340705	<i>TPMI</i>		rs111470259	0.187
59	chr15:63363652	<i>TPMI</i>		rs8519	0.307
60	chr15:63351873	<i>TPMI</i>	c.486T>C	rs11558747	0.034
61	chr15: 63351687	<i>TPMI</i>		rs4775614	0.8099
62	chr15: 63349132	<i>TPMI</i>		rs28485524	0.1164
63	chr15:35080523	<i>ACTC1</i>		rs604689	0.41
64	chr15:35080931	<i>ACTC1</i>		rs533021	0.477
65	chr15:35082141	<i>ACTC1</i>		rs1370155	0.128
66	chr15:35080939	<i>ACTC1</i>		rs112660730	0.024
67	chr15:35081574	<i>ACTC1</i>		rs589759	0.365
68	chr15:35082225	<i>ACTC1</i>		rs1370154	0.278
69	chr15:35084215	<i>ACTC1</i>		rs3729755	0.277
70	chr15:35083508	<i>ACTC1</i>		rs587780846	0.1388
71	chr10:88451869	<i>LDB3</i>		rs3740346	0.256
72	chr10:88469587	<i>LDB3</i>		rs3740347	0.357
73	chr10:88428158	<i>LDB3</i>		rs2803555	0.191

74	chr10:88428167	<i>LDB3</i>		rs11812601	0.354
75	chr10:88428335	<i>LDB3</i>		rs2803558	0.265
76	chr10:88445385	<i>LDB3</i>		rs3740345	0.399
77	chr10:88493858	<i>LDB3</i>		rs45602332	0.026
78	chr10:88494633	<i>LDB3</i>		rs35222021	0.295
79	chr10:88466465	<i>LDB3</i>	c.1074C>T	rs45459491	0.018
80	chr10:88494364	<i>LDB3</i>		rs34218952	0.295
81	chr10:88494531	<i>LDB3</i>		rs45516103	0.018
82	chr12:111350999	<i>MYL2</i>		rs2233260	0.167
83	chr12:111351029	<i>MYL2</i>		rs3833910	0.263
84	chr12:111353556	<i>MYL2</i>	c.132T>C	rs2301610	0.105
85	chr3:46899516	<i>MYL3</i>		rs1042973	0.206
86	chr3:46904812	<i>MYL3</i>	c.69C>T	rs2233264	0.044
87	chrX:153649813	<i>TAZ</i>		rs743547	0.114
88	chrX:153640060	<i>TAZ</i>		rs11388353	0.19