

Секвенирование нового поколения при внезапной сердечной смерти (пилотное исследование)Максимов В. Н.^{1,2}, Иваношук Д. Е.¹, Орлов П. С.¹, Иванова А. А.¹, Малютина С. К.^{1,2}, Максимова С. В.², Родина И. А.³, Хамович О. В.³, Новосёлов В. П.^{2,3}, Воевода М. И.^{1,2}**Цель.** Поиск причинных мутаций в генах-кандидатах, отвечающих за развитие внезапной сердечной смерти (ВСС) у мужчин, умерших в возрасте до 45 лет.**Материал и методы.** Группа ВСС (37 образцов) была сформирована с использованием критериев ВСС Всемирной организации здравоохранения и Европейского общества кардиологов. Аутопсийный материал был набран у внезапно умерших вне лечебно-профилактических учреждений мужчин, подвергшихся судебно-медицинскому исследованию по стандартному протоколу. При вскрытии не обнаружено морфологических изменений, которыми можно было бы объяснить внезапную смерть. Средний возраст 32,4±6,4 года. Геномную ДНК выделяли из ткани миокарда с помощью фенол-хлороформной экстракции. Выполняли секвенирование клинического экзема. На первом этапе проанализировали результаты секвенирования 24 генов, мутации в которых приводят к сердечно-сосудистым заболеваниям, ассоциированным с повышенным риском ВСС: *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *AKAP9*, *ANK2*, *CACNA1C*, *CALM1*, *CALM2*, *CAV3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *SCN4B*, *SNTA1*, *MYH2*, *APOB*, *KCNA5*, *TGFB3*, *NEB*, *PDX1*, *FLNC*, *PLEC*, *KCND3*.**Результаты.** Из 37 образцов с ВСС при анализе результатов секвенирования 24 генов было обнаружено 13 вероятно патогенных миссенс-мутаций в 9 образцах (24,3%). Из 13 вероятно патогенных вариантов — 5 новые.**Заключение.** Подводя первые итоги пилотного исследования ВСС можно сделать следующие предварительные выводы: необходимо продолжение исследований в области молекулярной аутопсии в России, для повышения результативности поиска причинных мутаций желательное снижение возраста случаев ВСС включаемых в исследование, работа с семьями умерших ВСС, сотрудничество опытных специалистов — судебно-медицинского эксперта, лабораторного генетика, кардиолога.**Ключевые слова:** внезапная сердечная смерть, мутация, NGS, панель генов, экзом, молекулярная аутопсия.**Отношения и деятельность.** Работа поддержана грантом РФФИ № 17-29-06026, а также частично грантом № НШ-2595.2020.7 и бюджетными проектами № 0324-2016-0002, № 0120.0502961.¹Научно-исследовательский институт терапии и профилактической медицины — филиал ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск; ²ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский уни-верситет Минздрава России, Новосибирск; ³ГБУЗ Новосибирской области Новосибирское областное клиническое бюро судебно-медицинской экспертизы, Новосибирск, Россия.

Максимов В. Н.* — д.м.н., профессор, зав. лабораторией молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-7165-4496, Иваношук Д. Е. — н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-0403-545X, Орлов П. С. — н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0001-9371-2178, Иванова А. А. — к.м.н., м.н.с. лаборатории молекулярно-генетических исследований терапевтических заболеваний, ORCID: 0000-0002-9460-6294, Малютина С. К. — д.м.н., профессор, зав. лабораторией этиопатогенеза и клиники внутренних заболеваний, ORCID: 0000-0001-6539-0466, Максимова С. В. — студентка 3-го курса педиатрического факультета, ORCID: 0000-0002-2472-181X, Родина И. А. — к.м.н., врач судебно-медицинский эксперт, ORCID: 0000-0003-2799-0756, Хамович О. В. — к.м.н., врач судебно-медицинский эксперт, ORCID: 0000-0002-2960-193X, Новосёлов В. П. — д.м.н., профессор, зав. кафедрой судебной медицины, ORCID: 0000-0002-6312-5543, Воевода М. И. — д.м.н., академик РАН, руководитель научного направления фундаментальных и клинических исследований, ORCID: 0000-0001-9425-413X.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): medik11@mail.ru

ВСС — внезапная сердечная смерть, КМП — кардиомиопатия, СУИQT — синдром удлинённого интервала QT, CNV — copy number variation, вариация числа копий, gnomAD — genome aggregation database, база данных геномов, NGS — next-generation sequencing, секвенирование следующего поколения.

Рукопись получена 04.05.2020

Рецензия получена 22.06.2020

Принята к публикации 09.08.2020

**Для цитирования:** Максимов В. Н., Иваношук Д. Е., Орлов П. С., Иванова А. А., Малютина С. К., Максимова С. В., Родина И. А., Хамович О. В., Новосёлов В. П., Воевода М. И. Секвенирование нового поколения при внезапной сердечной смерти (пилотное исследование). *Российский кардиологический журнал*. 2020;25(10):3880. doi:10.15829/1560-4071-2020-3880**Next generation sequencing in sudden cardiac death (pilot study)**Maksimov V. N.^{1,2}, Ivanoshchuk D. E.¹, Orlov P. S.¹, Ivanova A. A.¹, Malyutina S. K.^{1,2}, Maksimova S. V.², Rodina I. A.³, Khamovich O. V.³, Novoselov V. P.^{2,3}, Voevoda M. I.^{1,2}**Aim.** To search for causal mutations in candidate genes responsible for the development of sudden cardiac death (SCD) in men who died under the age of 45.**Material and methods.** The SCD group (n=37) was formed using the criteria the World Health Organization and the European Society of Cardiology. Autopsy material was collected from men who died suddenly outside medical institutions and underwent forensic medical examination according to the standard protocol. Autopsy revealed no morphological changes that could explain sudden death. The mean age was 32,4±6,4 years. Genomic DNA was isolated from myocardial tissue using phenol-chloroform extraction. Clinical exome sequencing was performed. At first, we analyzed the results of sequencing of 24 genes, mutations in which lead to cardiovascular diseasesassociated with an increased risk of SCD: *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *AKAP9*, *ANK2*, *CACNA1C*, *CALM1*, *CALM2*, *CAV3*, *KCNE1*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *SCN4B*, *SNTA1*, *MYH2*, *APOB*, *KCNA5*, *TGFB3*, *NEB*, *PDX1*, *FLNC*, *PLEC*, *KCND3*.**Results.** Of 37 samples, we revealed 13 probable pathogenic missense mutations in 9 samples (24,3%). Of 13 probable pathogenic variants, 5 were new.**Conclusion.** This pilot study provides following conclusions: it is necessary to continue molecular autopsy research in Russia; to increase the effectiveness of detecting causal mutations, it is necessary to reduce the age of patients with SCD included in the study; studying the families of deceased; cooperation of experienced specialists — forensic pathologist, laboratory geneticist, cardiologist.

Key words: sudden cardiac death, mutation, NGS, gene panel, exome, molecular autopsy.

Relationships and Activities. This paper was supported by the Russian Foundation for Basic Research grant № 17-29-06026, partially by the grant № NSh-2595.2020.7, and budget projects № 0324-2016-0002, № 0120.0502961.

¹Research Institute of Therapy and Preventive Medicine, Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk; ²Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk; ³Novosibirsk Regional Clinical Bureau of Forensic Medicine, Novosibirsk, Russia.

Maksimov V.N.* ORCID: 0000-0002-7165-4496, Ivanoshchuk D.E. ORCID: 0000-0002-0403-545X, Orlov P.S. ORCID: 0000-0001-9371-2178, Ivanova A.A. ORCID:

0000-0002-9460-6294, Malyutina S.K. ORCID: 0000-0001-6539-0466, Maksimova S.V. ORCID: 0000-0002-2472-181X, Rodina I.A. ORCID: 0000-0003-2799-0756, Khamovich O.V. ORCID: 0000-0002-2960-193X, Novoselov V.P. ORCID: 0000-0002-6312-5543, Voevoda M.I. ORCID: 0000-0001-9425-413X.

*Corresponding author: medik11@mail.ru

Received: 04.05.2020 **Revision Received:** 22.06.2020 **Accepted:** 09.08.2020

For citation: Maksimov V.N., Ivanoshchuk D.E., Orlov P.S., Ivanova A.A., Malyutina S.K., Maksimova S.V., Rodina I.A., Khamovich O.V., Novoselov V.P., Voevoda M.I. Next generation sequencing in sudden cardiac death (pilot study). *Russian Journal of Cardiology*. 2020;25(10): 3880. (In Russ.) doi:10.15829/1560-4071-2020-3880

Внезапная сердечная смерть (ВСС) является одной из важных нерешенных проблем здравоохранения. Современные тенденции в медицине связаны с широким внедрением персонализированных превентивных стратегий, нацеленных на коррекцию факторов риска развития патологии и проведение первичной профилактики, что способствует снижению заболеваемости и смертности населения [1, 2]. В Соединенных Штатах >220 тыс. человек погибают от ВСС каждый год [3]. Известно, что внезапные смерти составляют 20% общей смертности и 50% сердечно-сосудистой смертности в западных странах [1]. В России разработаны Национальные рекомендации по определению риска и профилактике ВСС, в которых большую часть составляют именно рекомендации по коррекции факторов риска и профилактике развития ВСС, однако все они касаются лиц с уже известной сердечно-сосудистой патологией [4, 5]. Риск развития ВСС самый высокий у лиц, перенесших остановку сердца, инфаркт миокарда или имеющих сердечную недостаточность в анамнезе, но до 80% случаев ВСС развиваются у пациентов с асимптомным течением какого-либо сердечно-сосудистого заболевания [6]. ВСС представляет собой одну из наиболее важных нерешенных проблем в практике судебно-медицинской экспертизы из-за невозможности точно определить причину внезапной смерти. В последние три десятилетия были успешно идентифицированы причинные гены наследственных аритмий. В то же время стало очевидно, что генетическая архитектура этого патологического фенотипа более сложна, чем представлялось ранее [2, 7]. В настоящее время влияние генетики и генетического тестирования на клиническое ведение пациентов с этими заболеваниями не вызывает сомнений. В частности, генетические тесты являются важным инструментом для выявления предсимптомных индивидуумов, несущих генетический вариант, который предрасполагает их к ВСС. Высокопроизводительные технологии секвенирования предлагают новые возможности для более глубокого изучения генетического фона, лежащего в основе

этих смертельных заболеваний, и раннего выявления лиц, подверженных риску ВСС [1, 8-10]. Активно изучаются молекулярно-генетические маркеры ВСС, которые могут быть использованы при разработке стратегии диагностики предрасположенности и проведения профилактики ВСС у лиц как с известной, так и неизвестной сердечно-сосудистой патологией. Использование семейного подхода значительно повышает процент успешной молекулярной аутопсии, например, в испанском семейном исследовании он составил 80,4%, тогда как среди умерших пробандов только 23,3% [11]. Конечно, секвенирование следующего поколения (NGS) (в т.ч. и полногеномное секвенирование) при ВСС — это не панацея, но шаг в правильном направлении [12]. Предстоит преодолеть ещё много трудностей на пути накопления информации и опыта интерпретации, получаемых при NGS результатов. Очень показателен в этом смысле результат полногеномного секвенирования 17 супердолгожителей (110 лет и старше). На момент выполнения работы таких людей в мире было <100. Авторам не удалось обнаружить доказательств обогащения какими-то заменами их геномов по сравнению с контрольными геномами. Но была очень интересная находка: в геноме одного из долгожителей нашли патогенную мутацию в гене *DSC2*, предрасполагающую к аритмогенной кардиомиопатии (КМП) правого желудочка, о которой рекомендуется сообщать индивидууму при случайной находке (в соответствии с рекомендациями Американского колледжа медицинской генетики и геномики) [13].

В нескольких исследованиях были обнаружены варианты количества копий гена (CNV), ответственные за сердечно-сосудистые заболевания, связанные с ВСС, но очень мало проведено работ на больших группах пациентов, и они в основном сосредоточены на конкретной связанной с ВСС болезни. В исследовании Mates J, et al. (2018) опубликованы результаты поиска CNV в генах, ассоциированных с ВСС, в большой группе пациентов (n=1765). Пациенты перенесли внезапную необъяснимую смерть или имели наслед-

ственное заболевание сердца (КМП или каналопатия). Были идентифицированы 36 CNVs (2%), большинство из которых, по-видимому, играют патогенную роль. Частота CNVs среди случаев внезапной необъяснимой смерти у пациентов с КМП или каналопатией составила 1,4% (8/587), 2,3% (20/874) и 2,6% (8/304), соответственно. Частота выявления была особенно высокой при аритмогенной КМП (5,1%), синдроме удлиненного интервала QT (СУИQT) (4,7%) и дилатационной КМП (4,4%). Авторы полагают, что анализ CNVs должен проводиться как часть рутинного генетического тестирования случаев ВСС и у пациентов с заболеваниями, ассоциированными с ВСС [14].

Гетерозиготные мутации в гене *SCN5A* связаны с различными фенотипами аритмий. Степень тяжести фенотипа может варьироваться от изменений на электрокардиограмме (мягкий фенотип) до симптоматических аритмий, приводящих к обмороку, остановке сердца и ВСС (тяжелый фенотип), даже среди членов одной семьи, имеющих одинаковую мутацию. Стратификация риска для носителей мутаций в гене *SCN5A* остаётся нерешённой проблемой. В большой родословной с гетерозиготной мутацией в гене *SCN5A* с потерей функции (1936delC, Q646RfsX5) было обнаружено 22 носителя мутации. При анализе области промотора гена *SCN5A* (2800 п.н.) были идентифицированы 2 однонуклеотидных полиморфизма, связанные с тяжестью заболевания. То есть наличие специфических вариантов в промоторе увеличивает риск развития тяжелого фенотипа у гетерозиготных носителей мутации *SCN5A* с потерей функции. Предполагавшихся различий в метилировании генов, связанных с *SCN5A*, авторам обнаружить не удалось [15].

В Дании секвенировали панель из 100 генов в 72 случаях ВСС в возрасте до 50 лет. В 52 случаях причину установить при аутопсии не удалось. В 15 (28,9%) случаях были найдены вероятные причинные мутации. Хотя интерпретация данных NGS является сложной задачей, они помогают сначала судебно-медицинскому эксперту в установлении истинной причины трагического случая, а потом дают возможность кардиологу помочь родственникам молодых жертв ВСС [16].

В большом международном исследовании взяли в анализ 302 случая ВСС, из них 82 выживших пробандов с семьями (средний возраст ВСС 24 года; 65% мужчин), секвенировали панель из 77 генов [17]. Патогенный или вероятный патогенный вариант был выявлен в 40 из 302 случаев ВСС (13%). Сочетание молекулярной аутопсии с клинической оценкой в семьях выживших пациентов увеличило диагностический выход до 39%, что показывает важность семейного подхода, сочетания клинической и генетической оценки [17].

Таким образом, несмотря на проведенные исследования в области молекулярной аутопсии при ВСС, остаётся много вопросов, требующих дальнейшего изучения.

Материал и методы

Группа исследования: аутопсийный материал 37 внезапно умерших пациентов (мужчин) с диагнозом ВСС в возрасте от 20 до 45 лет. Средний возраст мужчин, включенных в группу ВСС, составил $32,4 \pm 6,4$ года. Исследование одобрено Этическим Комитетом НИИТПМ — филиал ИЦиГ СО РАН.

Диагноз выставлен с использованием критериев ВСС Всемирной организации здравоохранения и Европейского общества кардиологов [18]. Аутопсийный материал собран вне лечебно-профилактических учреждений г. Новосибирска, жителей, подвергшихся судебно-медицинскому исследованию, которое было проведено по стандартному протоколу на базе Новосибирского областного клинического бюро судебно-медицинской экспертизы. С учётом ограниченной информации о времени развития летального исхода в группу ВСС включены случаи смерти, развившиеся в течение одного часа или в течение не более 24 ч при отсутствии свидетелей смерти и расценённые по данным судебно-медицинского исследования как смерть сердечного генеза. Основные патологоанатомические диагнозы протоколов судебно-медицинского исследования лиц, включенных в группу ВСС, — острая коронарная недостаточность и острая недостаточность кровообращения. Критерии исключения из группы ВСС: наличие морфологических изменений ткани сердца, характерных для инфаркта миокарда, КМП. Кроме того, из группы исключены лица, находившиеся в состоянии алкогольного, наркотического опьянения, которое могло послужить причиной развития летального исхода или способствовать развитию летального исхода на фоне имеющейся сердечно-сосудистой патологии.

В ходе проведения судебно-медицинского исследования у умерших забиралась ткань миокарда массой 5–10 г, которая в дальнейшем хранилась при температуре -20°C в морозильной камере до этапа выделения ДНК. Геномную ДНК выделяли модифицированным фенол-хлороформным методом из миокарда мужчин, умерших от ВСС. Качество анализируемой ДНК оценено с помощью системы капиллярного электрофореза Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., США). Полноэкзомный анализ был выполнен на платформе HiSeq 1500 (Illumina, США). Для приготовления библиотек использовали набор SureSelect Focused Exome (Agilent Technologies, Inc., США). Биоинформационный анализ данных секвенирования был выполнен в системе NGSWizard на платформе Genomenal [19] и включал: картирование данных на геном человека (версия GRCh38), контроль качества, удаление дубликатов, выявление однонуклеотидных вариантов и инсерций/делеций в анализируемых участках. Аннотация полученных вариантов производилась с использованием базы данных геномов (gnomAD) [20] и ClinVar [21]. При анализе

Таблица 1

Варианты, вероятно ассоциированные с ВСС

Пациент	Ген	Однонуклеотидный полиморфизм	Замена аминокислоты	PolyPhen	Mutation Taster	FATHMM	PROVEAN	LIST (score)	gnomAD, MAF	ClinVar
2	KCNA5	rs139614200	p.Asp322His	P	D	D	D	0,877	0,00009239	CI
2	TGFB3	Новый	p.Asp109Val	D	D	T	D	0,847	-	-
12	NEB	Новый	Tyr5878Ser	D	D	T	D	0,741	-	-
12	PDX1	Новый	Met36Arg	P	D	D	N	0,714	-	-
18	FLNC	rs201572079	p.Gly553Ser	D	D	D	D	0,805	0,0002705	CI, D
19	FLNC	rs199935488	p.Thr435Met	P	N	D	D	0,918	0,00004834	U
22	PLEC	Новый	p.Ile2550Asn	D	D	T	D	0,901	-	-
30	APOB	Новый	p.Glu2008Asn	D	D	T	D	0,792	-	-
31	MYH2	rs762121316	p.Arg783Ter	-	-	D	-	-	0,00009556	D
34	KCND3	rs35027371	p.Arg549His	D	N	D	D	0,920	0,00009900	U
34	KCNH2	rs143512106	p.Arg885Cys	P	D	D	D	0,905	0,0002	U
34	SNTA1	rs770192754	p.Glu278Lys	N	D	-	D	0,876	0,00001	-
35	AKAP9	rs61757671	p.Glu2025Lys	P	D	T	D	0,824	0,001121	CI, P

Сокращения: D — damaging/deleterious (повреждающая), P — probable damage (вероятно повреждающая), T — tolerated (умеренное влияние), N — polymorphism (полиморфизм), MAF — minor allele frequency (частота минорного аллеля), U — uncertain significance (неопределенного значения), CI — conflicting interpretations (конфликт интерпретаций).

также учитывались данные тестирования *in silico* с помощью программ PolyPhen-2, Mutation Taster, SIFT, PROVEAN, FATHMM, LIST [22-26]. Варианты были выбраны на основе следующих критериев: локализация варианта в кодирующих участках (миссенс или нонсенс замены), замены сайтов сплайсинга с частотой редкого аллеля <1%, отсутствие гомозигот (согласно данным gnomAD). При анализе также учитывались данные тестирования *in silico* с помощью выбранных программы и отбирались варианты, патогенность которых была предсказана как минимум в четырёх случаях из пяти, для LIST на основании коэффициента прогноза >0,7. Варианты неопределенного значения и варианты с противоречивой интерпретацией (uncertain significance и Conflicting interpretations of pathogenicity согласно базе данных ClinVar) нами также были включены в анализ. Варианты с частотой встречаемости >0,01% и синонимичные варианты были исключены из анализа для ауто-сомно-доминантных заболеваний, как рекомендовано в руководстве по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (2019) [27]. Поиск функционально-значимых замен проводился, в первую очередь, в генах, ассоциированных с СУИQT по данным GeneReviews [28] — *KCNQ1*, *KCNH2*, *SCN5A*, *AKAP9*, *ANK2*, *CACNA1C*, *CALM1*, *CALM2*, *CAV3*, *KCNE1*, *KCNE2*, *KCNJ2*, *KCNJ5*, *SCN4B*, *SNTA1*, а также в *MYH2*, *APOB*, *KCNA5*, *TGFB3*, *NEB*, *PDX1*, *FLNC*, *PLEC*, *KCND3*. Выбор генов для анализа остаётся нерешённой проблемой: на первом этапе исследований год за годом увеличивалось количество генов, связанных с СУИQT, пока не достигло 17. Однако в начале 2020г вышли

статьи в которых подвергается сомнению участие всех этих генов в развитии СУИQT [29, 30].

Результаты и обсуждение

Из 37 образцов с ВСС при анализе результатов секвенирования 24 генов (секвенировали экзом, 24 гена — анализировали) было обнаружено 13 вероятно патогенных миссенс-мутаций в 9 образцах (24,3%). Из 13 вероятно патогенных вариантов — 5 новые. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Ген *KCNH2*, OMIM 152427 (potassium channel, voltage-gated, subfamily H, member 2), цитогенетическая локализация 7q36.1. Мутации в этом гене могут приводить к развитию двух синдромов — СУИQT 2 типа и укороченного интервала QT 1 типа [31]. В базе данных dbSNP имеется информация о 10120 изменениях последовательности нуклеотидов в этом гене, из которых 281 отнесено к категории патогенных, 139 — к вероятно патогенным, 340 — с неопределённым значением и ещё 25 для которых исследователи не пришли к единому мнению относительно категории [32]. Согласно базе данных HuGE Navigator, основная часть публикаций посвящена изучению связи этого гена с разными видами аритмий и связанных с ними фенотипов — ВСС, фибрилляция предсердий, синкопе, синдром Бругада, и т.д. [33]. В одном из исследуемых образцов обнаружена замена с.2653C>T, которая приводит к замене аминокислоты Arg885Cys в белке, rs143512106, частота редкого аллеля 0,0002, упоминаний этой замены в доступной литературе найти не удалось, однако при тестировании с помощью программ предсказания патогенности замен она отнесена к категории вероятно патогенных. В этом же образце обнаружена ещё одна новая замена

Таблица 2

Вариабельность процента найденных мутаций при ВСС в некоторых исследованиях

Количество ВСС	Количество генов	% успеха пробанд	Семейный анализ	Возраст	Автор, год	Примечание
10	174	30 — П 50 — НЗ	+	19-40	Hellenthal N, 2017	
27	95	44,4	-	-	Chanavat V, 2016	
28	экзом	43 — всего 21 — П, ВП	+	18,4±7,8	Shanks GW, 2017	
32	100	44	-	1-19	Anderson JH, 2016	ВСС на физической нагрузке
34	экзом	29,4	-	33,07±12,85 м 23,62±15,34 ж	Neubauer J, 2018	
42	242	23	+	30,2±16,1	Jiménez-Jáimez J, 2017	ВСС, выжившие
44	80	27,3	-	30,7±7,4	Zhang L, 2016	
52	100	28,9	-	До 50	Hertz CL, 2016	
61	100	34	-	1-50	Christiansen SL, 2016	
72	35	29	+	5-40	Mak CM, 2019	
119	55	30 — ВП 10 — П	-	До 50	Sanchez O, 2016	
197	6	5	-	22,6±14,4	Raju H, 2019	
302	77	13 — П, ВП	+	24 (17-33)	Lahrouchi N, 2017	ВСС, выжившие
600	49	2,5 — П, ВП	-	72±9	Khera AV, 2019	Проспективное

Сокращения: ВП — вероятно патогенная замена, ВСС — внезапная сердечная смерть, П — патогенная замена, НЗ — неясное значение.

в гене *SNTA1*: с.832G>A, которая приводит к замене аминокислоты Glu278Lys в белке (rs770192754). Ген *SNTA1*, OMIM 601017 (syntrophin, alpha-1), цитогенетическая локализация 20q11.21. Мутации в этом гене могут приводить к развитию СУИQT 12 типа [31]. В базе данных dbSNP имеется информация о 8684 изменениях последовательности нуклеотидов в этом гене [32]. При тестировании с помощью программ оценки влияния замена Glu278Lys отнесена к категории вариантов с конфликтом интерпретаций. Влияет ли как-то на риск развития ВСС носительство одновременно двух редких вариантов (*KCNH2*, Arg885Cys, и *SNTA1*, Glu278Lys) — однозначно сказать нельзя. Надёжных общепризнанных алгоритмов оценки влияния носительства нескольких мутаций в разных генах на фенотип — пока нет, но само понятие олигогенных заболеваний уже прочно вошло в обиход и идёт накопление информации об этих заболеваниях [34, 35]. Так, для сочетания мутации R800L в гене *SCN5A* с мутацией A261V в гене *SNTA1* показано усиление клинических проявлений СУИQT. Кроме того, авторы на культуре клеток доказали, что у носителей двух мутаций имеется усиление функции каналов с *SCN5A*, что увеличивает продолжительность потенциала действия и может привести к фенотипу СУИQT [36]. Замена A261V находится в том же экзоне гена, как и обнаруженная нами Glu278Lys. Помимо межгенных взаимодействий, в этом пилотном анализе мы не могли учесть и проверить модифицирующее влияние полиморфизмов на пенетрантность мутаций,

хотя в литературе есть указания на такую возможность [15], в т.ч. и в отношении гена *SNTA1*: обнаруженное в образцах ДНК детей и взрослых, умерших внезапно, сочетание полиморфизма P74L с мутацией A257G было проверено в эксперименте на клетках, который показал, что полиморфизм P74L значимо влияет на регистрируемые токи при наличии мутации A257G [37]. Такие факты подтверждают постоянно растущую картину сложности стратификации генетического риска аритмии и ВСС.

Из 37 образцов с ВСС при анализе результатов секвенирования 24 генов вероятно патогенные миссенс-мутации обнаружены в 24,3% образцов. Много это или мало? В таблице 2 приведены результаты 14 исследований ВСС. Они показывают, насколько сложно проводить сравнение полученных данных. В среднем в 30% образцах исследователям удалось найти патогенные или вероятно патогенные варианты. Но при более детальном сопоставлении результатов они оказываются очень разнообразными:

- 1) По количеству пациентов.
- 2) По соотношению мужчин/женщин.
- 3) По возрасту: минимальному, среднему, максимальному.
- 4) По количеству проанализированных генов и их перечню.
- 5) По составу изучаемых групп: только умершие ВСС; умершие ВСС и выжившие, только пробанды с ВСС; пробанды и их родственники.

6) С включением семейного анамнеза и данных обследования живых родственников и без этой информации.

7) С известными обстоятельствами смерти и состоянием здоровья до ВСС и без этой информации.

8) Исследования случай-контроль; исследования на базе проспективных когорт.

9) По критериям включения/исключения, ВСС на фоне: только каналопатии и КМП; с дополнением в виде ишемической болезни сердца и аортопатий (в т.ч. расслоение аорты) [3], на фоне семейной гиперхолестеринемии [38].

10) По расовой, этнической принадлежности умерших ВСС.

11) По доле мутаций в генах, ассоциированных с фенотипами повышенного риска ВСС. В одних случаях преобладают мутации в генах каналопатий, в других — КМП и т.д.

Поэтому без большого преувеличения можно сказать, что каждая статья по результатам исследования ВСС с помощью методов NGS представляет уникальные данные, сравнивать которые приходится очень осторожно, принимая во внимание вышеописанные различия. Остаются сложности анализа представителей русской популяции, связанные с их недостаточной представленностью в крупных проектах [39].

Ещё одна проблема, снижающая эффективность поиска причинных мутаций — пропуск больших сегментов ДНК при секвенировании экзонов. Gotway G, et al. изучили и сравнили результаты секвенирования 36 экзонов в 3 клинических лабораториях (2012-2016гг). Для генов консенсусной кодирующей последовательности среднее количество полностью покрытых генов значительно варьировалось: 12184 (69%), 11687 (66%) и 5989 (34%) для лабораторий А, В и С, соответственно. То есть имеется значительная несогласованность в покрытии генов экзона между лабораториями [40]. До сих пор отсутствуют удобные доступные инструменты для анализа, с помощью которых можно было бы быстро ответить на такой, казалось бы, простой вопрос: в анализируемом образце ДНК не найдены известные патогенные варианты в сотнях генов потому что их там нет, или потому что не прочитаны с приемлемым качеством участки, в которых они расположены? То есть, когда врач, ведущий пациента, читает в заключении по результатам секвенирования нового поколения, что не обнаружены патогенные варианты, это не означает, что их там нет. И, соответственно, это не ставит клинический диагноз под сомнение. Улучшается качество общедоступных баз данных, используемых программ, алгоритмов и критериев оценки патогенности найденных вариантов. Однако до достижения хорошего воспроизводимого результата пока всё-таки далеко. Масштабы проблемы трактовки значимости найденных вариантов можно представить на примере результатов, полученных при выполнении программы Trans-Omics for

Precision Medicine (TOPMed), которая направлена на выяснение генетической архитектуры и биологии заболеваний сердца, легких, крови, нарушений сна, с конечной целью в виде улучшения диагностики, лечения и профилактики. В 53581 образце найдено >400 млн однонуклеотидных и инсерционно-делеционных вариантов. 97% из них имеют частоту <1%, а 46% — синглтоны. С одной стороны — это большой шаг по значительному расширению возможностей для изучения вклада редких (до 0,01% по частоте) и некодирующих вариантов последовательностей в фенотипические проявления [41]. С другой стороны — это показывает с каким колоссальным объёмом информации ещё предстоит разобраться, как оценить влияние каждого отдельного варианта на функциональные свойства белка, на конечный(е) фенотип(ы) (особенно, с учётом плейотропности действия генов), как оценить результаты взаимодействия генов с обнаруженными редкими вариантами и полиморфизмами, как оценить эпигенетические влияния во всём их многообразии? Только продолжением исследований с разработкой новых подходов к анализу. А пока самым доступным работающим подходом остаётся фенотипический и генетический анализ здоровых и больных родственников пробанда, который, как показано многими исследователями, существенно повышает эффективность поиска причинных мутаций. Хотя, конечно, и этот подход не решает всех проблем, а требует значительных затрат времени и труда: Zaragoza MV, et al. (2016) пытались понять основные генетические механизмы, вызывающие синдром слабости синусового узла, и выявить потенциальные модификаторы, которые могут привести к внутрисемейной изменчивости в семье из нескольких поколений. Пробанд — 63-летний мужчина с семейным анамнезом (>10) с дисфункцией синусового узла, желудочковой аритмией, КМП, сердечной недостаточностью и внезапной смертью. Они успешно секвенировали 94% экзона пробанда, нашли 128563 уникальных варианта, из них 108795 (85%) находились в 16319 генах из 19056 генов-мишеней. Чтобы идентифицировать возможные мутации, авторы сфокусировались на 2000 вариантах, расположенных в 237 генах из 283 известных генов аритмий, каналопатий, КМП. После их фильтрации с учётом зиготности, влияния на белок, информации в базах данных, остался 41 вариант в 33 генах (21 из 41 варианта был проверен с помощью секвенирования по Сэнгеру). В конечном итоге они выбрали 9 подтвержденных вариантов с частотами аллелей <1% для семейного анализа и нашли новую замену с.357-2A>G в сайте сплайсинга в гене *LMNA*, а также ряд редких или новых вариантов в генах *HSCN4*, *MYBPC3*, *PKP4*, *TMPO*, *TTN*, *DMPK* и *KCNJ10* в качестве потенциальных модификаторов [42].

Во всероссийских клинических рекомендациях по ВСС от 2017г предлагается “рассмотреть вопрос о проведении посмертного генетического исследова-

ния при подозрении на врождённое структурное заболевание сердца или на врождённые нарушения ритма/проводимости сердца как возможной причины ВСС” [5]. Поскольку “становится возможным своевременное обследование и генетический скрининг родственников... Посмертный молекулярно-генетический анализ следует выполнять всем жертвам ВСС при подозрении на генетически детерминированные нарушения ритма сердца”. Для практической реализации этих рекомендаций необходимо сотрудничество опытных специалистов — судебно-медицинского эксперта, лабораторного генетика, кардиолога.

Заключение

Подводя первые итоги пилотного исследования ВСС, можно сделать следующие предварительные выводы: необходимо продолжение исследований в области молекулярной аутопсии в России. Для повышения результативности поиска причинных мутаций желательно снижение возраста случаев ВСС, включаемых в исследование, работа с семьями умерших ВСС.

Отношения и деятельность. Работа поддержана грантом РФФИ № 17-29-06026, а также частично грантом № НШ-2595.2020.7 и бюджетными проектами № 0324-2016-0002, № 0120.0502961.

Литература/References

- Morini E, Sanguiuolo F, Caporossi D, et al. Application of Next Generation Sequencing for personalized medicine for sudden cardiac death. *Front Genet.* 2015;6:55. doi:10.3389/fgene.2015.00055.
- Mizusawa Y. Recent advances in genetic testing and counseling for inherited arrhythmias. *J Arrhythm.* 2016;32(5):389-97. doi:10.1016/j.joa.2015.12.009.
- Khera AV, Mason-Suares H, Brockman D, et al. Rare Genetic Variants Associated With Sudden Cardiac Death in Adults. *J Am Coll Cardiol.* 2019;74(21):2623-34. doi:10.1016/j.jacc.2019.08.1060.
- Shlyakhto EV, Arutjunov GP, Belenkov YuN, Ardashov AV. Recommendations for risk assessment and prevention of sudden cardiac death. *Archive of internal medicine.* 2013;(4):5-15. (In Russ.) Шляхто Е.В., Арутюнов Г.П., Беленков Ю.Н., Ардашев А.В. Национальные рекомендации по определению риска и профилактике внезапной сердечной смерти. *Архив внутренней медицины.* 2013;(4):5-15.
- Revishvili ASH, Neminuschiy NM, Batalov RE, et al. All-Russian clinical guidelines for controlling the risk of sudden cardiac arrest and sudden cardiac death, prevention and first aid. *Vestnik aritmologii.* 2017;(89):2-104. (In Russ.) Ревишвили А.Ш., Неминущий Н.М., Баталов Р.Е. и др. Всероссийские клинические рекомендации по контролю над риском внезапной остановки сердца и внезапной сердечной смерти, профилактике и оказанию первой помощи. *Вестник аритмологии.* 2017;(89):2-104.
- Fragli A, Underwood K, Priori SG, Mazzanti A. Is There a Role for Genetics in the Prevention of Sudden Cardiac Death? *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2016;27(9):1124-32. doi:10.1111/jce.13028.
- Neubauer J, Lecca MR, Russo G, et al. Exome analysis in 34 sudden unexplained death (SUD) victims mainly identified variants in channelopathy-associated genes. *Int J Legal Med.* 2018;132(4):1057-65. doi:10.1007/s00414-018-1775-y.
- Loporcaro CG, Tester DJ, Maleszewski JJ, et al. Confirmation of cause and manner of death via a comprehensive cardiac autopsy including whole exome next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(8):1083-9. doi:10.5858/arpa.2013-0479-SA.
- Hertz CL, Christiansen SL, Ferrero-Miliani L, et al. Next-generation sequencing of 34 genes in sudden unexplained death victims in forensics and in patients with channelopathic cardiac diseases. *Int J Legal Med.* 2015;129(4):793-800. doi:10.1007/s00414-014-1105-y.
- Narula N, Tester DJ, Paulmichl A, et al. Post-mortem Whole exome sequencing with gene-specific analysis for autopsy-negative sudden unexplained death in the young: a case series. *Pediatr Cardiol.* 2015;36(4):768-78. doi:10.1007/s00246-014-1082-4.
- Jiménez-Jáimez J, Alcalde Martínez V, Jiménez Fernández M, et al. Clinical and Genetic Diagnosis of Nonischemic Sudden Cardiac Death. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 2017;70(10):808-16. doi:10.1016/j.rec.2017.04.024.
- Beauséjour Ladouceur V, Abrams DJ. Whole-Exome Molecular Autopsy After Exertional Sudden Cardiac Death: Not a Panacea but a Step in the Right Direction. *Circ Cardiovasc Genet.* 2016;9(3):210-2. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001484.
- Gierman HJ, Fortney K, Roach JC, et al. Whole-genome sequencing of the world's oldest people. *PLoS One.* 2014;9(11):e112430. doi:10.1371/journal.pone.0112430.
- Mates J, Mademont-Soler I, Del Olmo B, et al. Role of copy number variants in sudden cardiac death and related diseases: genetic analysis and translation into clinical practice. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(7):1014-25. doi:10.1038/s41431-018-0119-1.
- Park JK, Martin LJ, Zhang X, et al. Genetic variants in SCN5A promoter are associated with arrhythmia phenotype severity in patients with heterozygous loss-of-function mutation. *Heart Rhythm.* 2012;9(7):1090-6. doi:10.1016/j.hrthm.2012.02.023.
- Hertz CL, Christiansen SL, Ferrero-Miliani L, et al. Next-generation sequencing of 100 candidate genes in young victims of suspected sudden cardiac death with structural abnormalities of the heart. *Int J Legal Med.* 2016;130(1):91-102. doi:10.1007/s00414-015-1261-8.
- Lahrouchi N, Raju H, Lodder EM, et al. Utility of Post-Mortem Genetic Testing in Cases of Sudden Arrhythmic Death Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2017;69(17):2134-45. doi:10.1016/j.jacc.2017.02.046.
- Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, et al. The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eurpace.* 2015;17(11):1601-87. doi:10.1093/europace/euv319.
- NGSWizard на платформе Genomenal. <https://ru.genomenal.com/>.
- GNOMAD. <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
- ClinVar. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>.
- Mutation Taster. <http://www.mutationtaster.org/>.
- PolyPhen-2. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
- PROVEAN. <http://provean.jcvi.org/index.php>.
- FATHMM. <http://fathmm.biocompute.org.uk/>.
- LIST. <http://list.msl.ubc.ca/>.
- Ryzhkova OP, Kardymon OL, Prohorchuk EB, et al. Guidelines for the interpretation of massive parallel sequencing variants (update 2018, v2). *Medical genetics.* 2019;18(2):3-23. (In Russ.) Рыжкова О.П., Кардымон О.Л., Прохорчук Е.Б. и др. Руководство по интерпретации данных последовательности ДНК человека, полученных методами массового параллельного секвенирования (MPS) (редакция 2018, версия 2). *Медицинская генетика.* 2019;18(2):3-23. doi:10.25557/2073-7998.2019.02.3-23.
- GeneReviews. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1129/>.
- Adler A, Novelli V, Amin AS, et al. An International, Multicentered, Evidence-Based Reappraisal of Genes Reported to Cause Congenital Long QT Syndrome. *Circulation.* 2020;141(6):418-28. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043132.
- Waddell-Smith KE, Skinner JR, Bos JM. Pre-Test Probability and Genes and Variants of Uncertain Significance in Familial Long QT Syndrome. *Heart Lung Circ.* 2020;29(4):512-9. doi:10.1016/j.hlc.2019.12.011.
- OMIM Online Mendelian Inheritance in Man. <http://omim.org/>.
- dbSNP. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>.
- HuGE Navigator. <https://phgkb.cdc.gov/PHGKB/hNHome.action>.
- Shigemizu D, Aiba T, Nakagawa H, et al. Exome Analyses of Long QT Syndrome Reveal Candidate Pathogenic Mutations in Calmodulin-Interacting Genes. *PLoS ONE.* 2015;10(7):e0130329. doi:10.1371/journal.pone.0130329.
- Human genetics according to Vogel and Motulsky. *Problems and approaches.* Ed. Speicher MR, Antonarakis SE, Motulsky AG. St. Petersburg: Publishing N-L, 2013. p.1056. (In Russ.) Генетика человека по Фогелю и Мотулски. Проблемы и подходы. Ред. Спейчер М.Р., Антонаракис С.Е., Мотулски А.Г. СПб.: Изд-во Н-Л, 2013. 1056 с. ISBN: 978-5-94869-167-1.
- Hu RM, Tan BH, Orland KM, et al. Digenic inheritance novel mutations in SCN5a and SNTA1 increase late I(Na) contributing to LQT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;304(7):H994-H1001. doi:10.1152/ajpheart.00705.2012.
- Cheng J, Norstrand DW, Medeiros-Domingo A, et al. LQTS-associated mutation A257G in α -synthrophin interacts with the intragenic variant P74L to modify its biophysical phenotype. *Cardiogenetics.* 2011;1(1):136. doi:10.4081/cardiogenetics.2011.e13.
- Larsen MK, Nissen PH, Kristensen IB, et al. Sudden cardiac death in young adults: environmental risk factors and genetic aspects of premature atherosclerosis. *J Forensic Sci.* 2012;57(3):658-62. doi:10.1111/j.1556-4029.2011.02028.x.
- Barbitoff YA, Skitchenko RK, Poleshchuk OI, et al. Whole-exome sequencing provides insights into monogenic disease prevalence in Northwest Russia. *Mol Genet Genomic Med.* 2019;7(11):e964. doi:10.1002/mgg3.964.
- Gotway G, Crossley E, Kozlitina J, et al. Clinical Exome Studies Have Inconsistent Coverage. *Clinical Chemistry.* 2020;66(1):199-206. doi:10.1093/clinchem.2019.306795.
- Taliun D, Harris DN, Kessler MD, et al. Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed Program. *BioRxiv.* 2019. 563866. doi:10.1101/563866.
- Zaragoza MV, Fung L, Jensen E, et al. Exome Sequencing Identifies a Novel LMNA Splice-Site Mutation and Multigenic Heterozygosity of Potential Modifiers in a Family with Sick Sinus Syndrome, Dilated Cardiomyopathy, and Sudden Cardiac Death. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155421. doi:10.1371/journal.pone.0155421.