

МУТАЦИИ И РЕДКИЕ ВАРИАНТЫ ГЕНА ДЕСМИНА В КАЧЕСТВЕ ПРИЧИН РАЗВИТИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ КАРДИОМИОПАТИЙ

А.Я. Гудкова^{1,2}, Н.А. Смолина^{1,2}, Е.Н. Семернин^{1,2}, А.Н. Крутиков¹, А.А. Костарева^{1,2}

¹ ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский Медицинский Университет им. И.П. Павлова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Гудкова Александра Яковлевна — доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник НИЛ молекулярной кардиологии ФГБУ «Федерального медицинского исследовательского центра им. В.А. Алмазова» Минздрава России (ФМИЦ им. В.А. Алмазова), руководитель НИЛ кардиомиопатий института сердечно-сосудистых заболеваний ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский Медицинский Университет им. И.П. Павлова» Минздрава России; *Смолина Наталья Александровна* — научный сотрудник лаборатории молекулярной кардиологии института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова; *Семернин Евгений Николаевич* — кандидат медицинских наук, руководитель отдела инфилтративных заболеваний миокарда института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова; *Крутиков Александр Николаевич* — кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела инфилтративных заболеваний миокарда института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова; *Костарева Анна Александровна* — кандидат медицинских наук, директор института молекулярной биологии и генетики ФМИЦ им. В.А. Алмазова.

Контактная информация: ФГБУ «Федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург, Россия, 197341. Тел.: +7(812)702–37–87. E-mail: kostareva@almazovcentre.ru (Костарева Анна Александровна).

Резюме

Задачи данной работы — анализ частоты и структуры мутаций и редких вариантов гена десмина (*DES*) в различных группах больных с кардиомиопатиями: дилатационной (ДКМП), гипертрофической (ГКМП) и рестриктивной (РКМП). **Материалы и методы.** Когорты пациентов с кардиомиопатиями формировались на базе клиник ФМИЦ им. В.А. Алмазова и кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. И.П.Павлова. Группа больных ДКМП включала 98 человек, ГКМП — 40, РКМП — 20. Диагноз кардиомиопатии устанавливался по данным клинической картины заболевания, эхокардиографии и после исключения всех вторичных причин. Секвенирование гена десмина проводилось по методике Сенгера с помощью капиллярного электрофореза после выделения ДНК из лимфоцитов периферической крови и амплификации методом ПЦР. Оценка структурных нарушений, ассоциированных с редким вариантом гена десмина A213V, проводилась при помощи флуоресцентной микроскопии клеток HeLa после окраски антителами к десмину и виментину. **Результаты.** В группе больных ДКМП обнаружена одна патогенная мутация десмина, приводящая к нарушению сплайсинга, и один редкий генетический вариант A213V. В группе больных с РКМП также обнаружена одна патогенная мутация, нарушающая сплайсинг гена. Патогенных замен в гене десмина в группе больных ГКМП обнаружено не было. Трансфекция клеток HeLa выявила умеренное нарушение структуры десмина и виментина вследствие A213V замены. **Выводы.** Мутации гена десмина являются редкой причиной генетически обусловленных ДКМП и РКМП. Редкий вариант гена A213V замены вызывает умеренные структурные нарушения внутриклеточной локализации промежуточных филаментов.

Ключевые слова: кардиомиопатия, мутация, десмин, трансфекция, промежуточные филаменты.

MUTATIONS AND RARE VARIANTS OF DESMIN GENE AS THE CAUSE OF DIFFERENT CARDIOMYOPATHIES

A.Ya. Gudkova^{1,2}, N. A. Smolina^{1,2}, E.N. Semernin^{1,2}, A.N. Krutikov¹, A.A. Kostareva^{1,2}

¹ Federal Almazov Medical Research Centre, St. Petersburg

² Pavlov State Medical University, St. Petersburg

Corresponding author: Federal Almazov Medical Research Centre, 2 Akkuratova st., St. Petersburg, Russia, 197341. Tel.: +7(812)702-37-77 (Alexandra Ya. Gudkova — MD, PhD, heading researcher of research laboratory of molecular biology Federal Almazov Medical Research Centre, head of cardiomyopathy laboratory in First Pavlov State Medical University).

Abstract

Objective. Several desmin mutations have been described over the past years in patients with dilated and restrictive cardiomyopathy, often in association with distal myopathy. However, the role of desmin mutations as a cause of various types of cardiomyopathy is still undetermined. The aim of this study was to analyse the frequency of desmin mutations in patients with dilated, hypertrophic and restrictive cardiomyopathy identified and diagnosed in the St. Petersburg area of Russia. **Material, methods and results.** We screened 98 patients with dilated, 40 with hypertrophic and 20 with restrictive cardiomyopathy. All exons of the desmin gene were amplified by PCR and studied by sequencing. Two of 98 patients with dilated cardiomyopathy and 1 patient with restrictive cardiomyopathy showed the presence of desmin gene mutations, not previously described. An A213V shift, suspected to represent a conditional mutation, was associated with a case of late-onset dilated cardiomyopathy. Functional studies confirmed mild structural defect caused by A213V variant and revealed by desmin and vimentin staining. No desmin mutations were found in patients with hypertrophic cardiomyopathy.

We conclude that desmin mutations should be considered a relatively rare cause of dilated and restrictive cardiomyopathy. Rare desmin variant A213V causes mild structural defect on intracellular intermediate filament network.

Key words: cardiomyopathy, desmin, mutation, transfection, intermediate filaments.

Статья поступила в редакцию 15.05.14 и принята к печати 23.05.14.

Кардиомиопатии (КМП) — хронические заболевания миокарда, сопровождающиеся нарушением функции сердца. Долгое время этиология кардиомиопатий оставалась неизвестной. В 1990 году С. Seidman и соавторы впервые описали мутацию гена белка β -миозина в качестве причины развития гипертрофической кардиомиопатии. Это послужило толчком к изучению генетической природы этой группы заболеваний и открытию новых мутаций, приводящих к развитию КМП. Первыми были описаны генетические дефекты, связанные с развитием гипертрофической КМП (ГКМП) (Burton D. et al., 2002; Geisterfer-Lowrance A.A. et al., 1990; Moolman J.C. et al., 1997; Niimura H. et al., 1998; Poetter K. et al., 1996; Regitz-Zagrosek V. Et al., 2000; Satoh M. et al., 1999). Большинство описанных мутаций затрагивало гены, кодирующие белки саркомера, что привело к возникновению гипотезы о том, что ГКМП является «болезнью саркомера». Позже были описаны мутации, связанные с развитием дилатационной КМП (ДКМП) [1–3]. Большинство

из них затрагивало структуру генов, кодирующих белки цитоскелета, что послужило причиной возникновения гипотезы о том, что ДКМП связана с нарушением цитоскелета клетки. Однако в последнее время накапливаются данные о том, что мутации одного и того же гена (и даже одни и те же мутации) могут вызывать развитие как ГКМП, так и ДКМП, а также, в ряде случаев, и рестриктивной КМП (РКМП) [4, 5]. Таким образом, в настоящее время течение заболевания определяется не столько пораженным геном, сколько конкретными нарушениями структурных и функциональных связей, возникающих вследствие его конкретного дефекта.

Одним из генов, описанных в связи с развитием ДКМП, является ген десмина. Десмин, белок цитоскелета, относится к группе промежуточных филаментов. Он экспрессируется во всех трех типах мышечной ткани — гладкой, сердечной и поперечно-полосатой скелетной, являясь основным представителем группы промежуточных филаментов в зрелых мышечных клетках. Фенотипическим

проявлением мутаций гена десмина может являться кардиомиопатия или дистальная миопатия, однако в ряде случаев встречается сочетанный фенотип [6]. При этом поражение сердечно-сосудистой системы зачастую является определяющим для тяжести течения заболевания и его прогноза. К настоящему времени проведено три исследования, выявляющие частоту развития кардиомиопатий на фоне мутаций гена десмина [7, 8]. В первом из них, проведенном F. Tesson и соавторами в 2000 году, с помощью метода конформационного полиморфизма было обследовано 43 пациента с ДКМП. Мутаций гена десмина в данной группе больных выявлено не было. Во втором исследовании, проведенном в 2001 году, Y. Miyamoto и соавторы скринировали восьмой экзон гена десмина у 265 пациентов с ДКМП методом конформационного полиморфизма и обнаружили мутации в 3 случаях. Однако на сегодняшний день известно, что метод конформационного полиморфизма не является методом выбора для идентификации мутаций, так как дает ложно-отрицательные результаты примерно в 15 % случаев. Наибольшей информативностью обладает исследование M. Taylor и соавторов, показавшее также небольшую частоту мутаций гена десмина в качестве причин развития идиопатической дилатационной кардиомиопатии. Исследований, оценивающих причинную роль мутаций гена десмина одновременно в нескольких группах кардиомиопатий (ДКМП, РКМП и ГКМП), не проводилось. Поскольку определение частоты мутаций гена десмина у больных кардиомиопатиями, а также особенностей патогенеза кардиомиопатии и миопатии, вызванных патологией десмина, представляется актуальным, целью нашего исследования стало изучение частоты мутаций гена десмина в качестве причины первичных кардиомиопатий. Также нами были проведены исследования влияния мутаций гена десмина на структуру и полимеризацию промежуточных филаментов в клетках.

Материалы и методы

Материалом для генетического анализа послужила периферическая кровь больных с диагнозом первичной дилатационной, гипертрофической и рестриктивной кардиомиопатии (ДКМП, ГКМП, РКМП), находящихся на лечении в клиниках кафедры факультетской терапии СПбГМУ им. Павлова, ФМИЦ им. В.А. Алмазова и кардиологических клиниках Больницы № 1 г. Санкт-Петербурга в период с 1998 по 2014 год. Группа больных ДКМП включала 98 человек, ГКМП — 40, РКМП — 20. Данные о клиническом течении заболевания, данные семейного анамнеза и инструментальные данные были

получены на основе анализа клинических историй болезни. В качестве контрольного генетического материала использовалась периферическая кровь 200 условно здоровых индивидуумов (400 наборов хромосом). Исследование было одобрено этическими комитетами СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, ФМИЦ им. В.А. Алмазова и Каролинского медицинского института г. Стокгольма, Швеция.

Секвенирование гена десмина

Забор крови исследуемых больных производился с использованием этилендинитрилтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Геномная ДНК выделялась из крови методом фенол-хлороформной экстракции. Все кодирующие экзоны гена десмина (*DES*) были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). После амплификации продукты ПЦР изолировались с помощью набора для очищения ПЦР продуктов (Montage PCR, Millipore, каталоговый номер UFC7PC250). Циклическое секвенирование продуктов проводилось с использованием набора Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit версии 3.0 (Applied Biosystems, каталоговый номер 4390244) в соответствии с инструкциями производителя. Электрофоретический анализ продуктов циклического секвенирования производился на установке ABI PRISM 377. Обработка полученных данных производилась с помощью программы BioEdit.

Создание плазмиды и кодон-направленный мутагенез *in vitro*

Для функционального исследования обнаруженных мутаций использовался метод трансфекций клеток плазмидной ДНК, содержащей мутантную форму гена десмина. С целью создания плазмиды клонированный участок ДНК гена десмина мыши, полученный с помощью ПЦР с использованием обратной транскриптазы, был субклонирован в рВК RSV вектор. Кодон-специфический *in vitro* мутагенез с целью получения замены A213V в гене десмина был произведен с помощью специфических праймеров и *pfu*-ДНК полимеразы. Полученный продукт использовался для трансформации XL1 Blue суперкомпетентных клеток (Stratagene, каталоговый номер 200236). После инокуляции колоний выделение плазмид производилось с использованием Plasmid Mini Kit (Qiagen, каталоговый номер 12125); положительные клоны определялись с помощью реакции циклического секвенирования с использованием BigDye Terminator Sequencing Kit версии 3, Applied Biosystems, каталоговый номер 4390244).

Трансфекция клеток

Культивирование клеточной линии HeLa проводилось в среде Optimem, содержащей L-глутамат,

гентамицин (1 мкг/мл) и 10 % телячью сыворотку. Трансфекции проводились с помощью реагента FuGene (Roche) в соответствии с инструкциями производителя с использованием 1 мкг плазмидной ДНК, содержащей нормальный или A213V ген десмина. Фиксация клеток производилась через 72 часа с помощью 4 % раствора формальдегида в фосфатном буфере.

Иммуноцитохимическое окрашивание

Двойное иммуноцитохимическое окрашивание клеток после проведения трансфекций проводилось по следующей схеме. После увеличения проницаемости клеточных мембран с помощью 0,5 % раствора Тритона в фосфатном буфере в течение 5 минут и последующего отмывания в фосфатном буфере неспецифическое окрашивание блокировалось с помощью 15 % телячьей сыворотки в течение 30 минут. Последующая инкубация с первичными поликлональными антидесминовыми антителами (ДАКО, каталоговый номер A0611) в разведении 1:200 производилась в течение 1,5 часов при комнатной температуре. После промывания в фосфатном буфере клетки окрашивались с помощью вторичных TRITC-конъюгированных антикроличьих антител (ДАКО, каталоговый номер R0156) в разведении 1:50 в течение 40 минут. После вторичного блокирования с помощью 10 % нормальной кроличьей сыворотки в течение 1 часа препараты окрашивались моноклональными антивиментиновыми антителами (ДАКО, каталоговый номер M7020) в разведении 1:200 с последующим окрашиванием вторичными FITC-конъюгированными антимышиными антителами (ДАКО, каталоговый номер F0261) в разведении 1:50 в течение 40 минут. Для ядерного окрашивания использовался реактив DAPI.

Результаты исследования

Мутации гена десмина у больных с кардиомиопатиями

Нами был проведен генетический анализ крови 98 больных с дилатационной, 40 больных с гипертрофической и 20 больных с рестриктивной кардиомиопатиями (ДКМП, ГКМП и РКМП соответственно). В группе больных с ДКМП у двух

больных были обнаружены гетерозиготные замены в гене десмина. Первая замена (IVS2-2A→G) затрагивала акцептерный участок сплайсингового региона 3 экзона и отвечала всем критериям патогенности по данным структурного моделирования *in vitro* с помощью программы PolyPhen. Предположительно данная мутация приводит к нарушению сплайсинга третьего экзона, и, как следствие, к полной его делеции (Рис. 1). Второй вариант, приводящий к замене аланина на валин в положении 213 (A213V), был обнаружен в конечной части второго экзона. Третья замена, IVS3+1G→A, также носила характер сплайсинговой, отвечала всем критериям патогенности, приводила к делеции 3 экзона и была обнаружена у больного с РКМП. Среди 200 контрольных образцов (400 наборов ДНК) сплайсинг-мутаций IVS2-2A→G и IVS3+1G→A обнаружено не было. Однако среди тех же контрольных образцов крови замена A213V была обнаружена в двух случаях без клинических признаков заболевания. В группе ГКМП мутаций гена десмина обнаружено не было. Помимо трех описанных мутаций, был обнаружен один впервые выявленный вариант и три уже известных варианта полиморфизма гена десмина. Список обнаруженных вариантов полиморфизма гена десмина представлен в Таблице 1.

Клиническая картина заболевания у пациентов с КМП, вызванной сплайсинговыми мутациями гена десмина

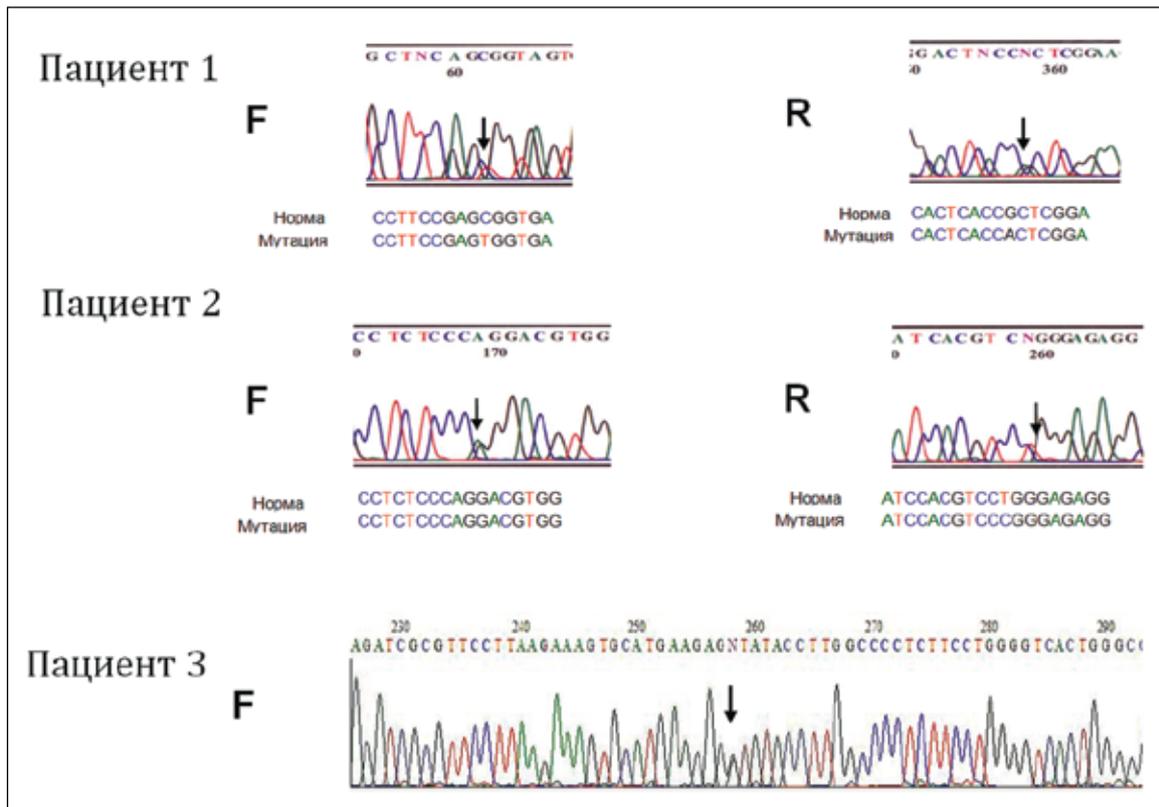
Мутация IVS2-2A→G была обнаружена у мужчины с ДКМП и отсутствием признаков скелетной миопатии. Диагноз ДКМП был впервые поставлен больному в возрасте 19 лет. Поводом для проведения клинического обследования послужили жалобы на одышку и снижение толерантности к физическим нагрузкам. При обследовании были обнаружены значительная кардиомегалия и снижение систолической функции сердца (медицинская клиническая документация отсутствует). В возрасте 22 лет у больного были выявлены постоянная форма мерцательной аритмии и признаки застойной сердечной недостаточности. В возрасте 27 лет после повторных синкопальных эпизодов была выявлена полная атриовентрикулярная блокада на фоне фибрилляции

Таблица 1

ВАРИАНТЫ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА ДЕСМИНА У БОЛЬНЫХ КАРДИОМИОПАТИЯМИ

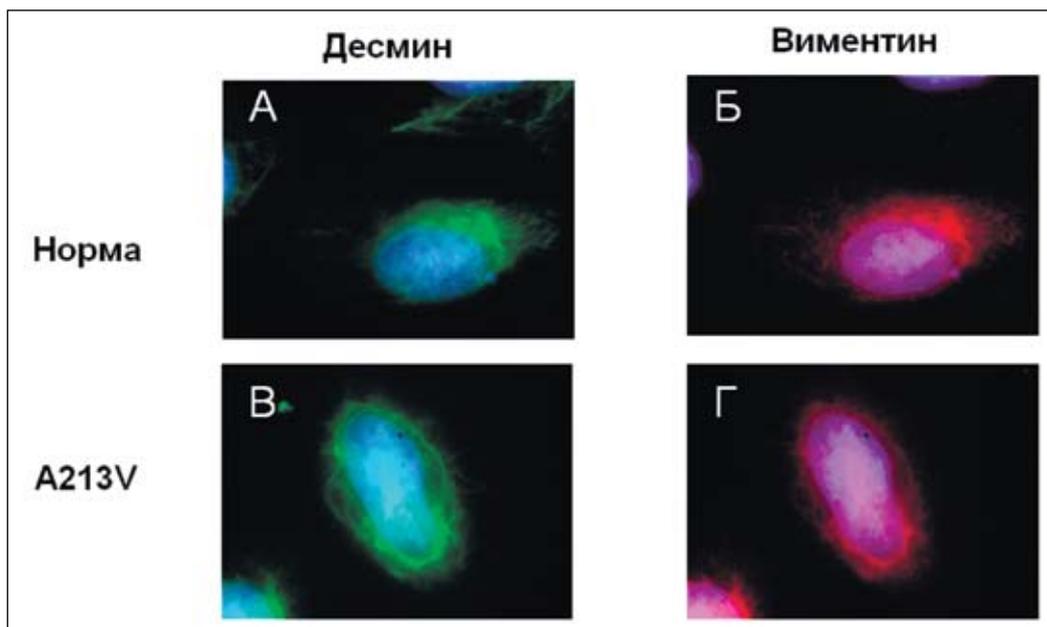
Локализация	Номер нуклеотидного основания	Референтная последовательность	Установленная последовательность	Аминокислотная замена	Литературная ссылка
Exon 3	5091	ATT	ATC	I222I	No
Exon 4	5398	GAT	GAC	D275D	[9]
Exon 5	5762	CTC	CTG	L337L	[10]
Exon 6	6237	GCA	GCG	A367A	[9]

Рисунок 1. Мутации гена десмина, обнаруженные методом секвенирования



Примечание: А. Сплайсинговая мутация IVS2+2A→G.
 Б. Точечная мутация A213V. Прямой (F) и обратный (R) праймеры.
 ↓ — место нуклеотидной замены.

Рисунок 2. Функциональное исследование естественного и мутантного A213V генов десмина в культуре клеток HeLa



Примечание: А, В — окраска с помощью антител к десмину.
 Б, Г — окраска с помощью антител к виментину.

Таблица 2

**ДАННЫЕ ЭХОКАРДИОГРАФИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ ДКМП И РКМП,
ВЫЗВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ МУТАЦИЯМИ ГЕНА ДЕСМИНА**

	КДРЛЖ (мм)	КСРЛЖ (мм)	МЖП (мм)	ЗСЛЖс (мм)	ЛП (мм)	КДРПЖ (мм)	СПЖ (мм)	ПП (мм)	Ао (мм)	ЛА (мм)	ФВ %
Пациент 1 (IVS2+2A→G мутация)	42	33	11	11	58	41	4	69	29	28	34
Пациент 2 (A213V замена)	70	64	9	9	54	32	–	64	35	26	19
Пациент 3 (IVS3+1G→A мутация)	51	36	13	12	50	40	3	58	30	50	67

Примечание: КДРЛЖ — конечно-диастолический размер левого желудочка; КСРЛЖ — конечно-систолический размер левого желудочка; МЖП — межжелудочковая перегородка; ЗСЛЖс — толщина задней стенки левого желудочка в систолу; ЛП — размер левого предсердия; КДРПЖ — конечно-диастолический размер правого желудочка; СПЖ — стенка правого желудочка; ПП — размер правого предсердия; Ао — диаметр аорты; ЛА — диаметр легочной артерии; ФВ — фракция выброса левого желудочка

предсердий (синдром Фредерика), в связи с чем больному был установлен электрокардиостимулятор. В это же время при эхокардиографическом исследовании были выявлены значительное увеличение всех камер сердца с преобладанием дилатации правого желудочка, увеличение обоих предсердий, отсутствие гипертрофии миокарда, парадоксальное движение межжелудочковой перегородки и ее локальный фиброз, дисфункция папиллярных мышц, признаки легочной гипертензии и выпот в полости перикарда (Таблица 2).

В последующем периоде отмечалось прогрессирующее расширение границ сердца, в особенности правого желудочка, снижение систолической функции сердца и формирование тромбов в полостях сердца. Больной перенес несколько эпизодов нарушения мозгового кровообращения эмболического генеза и повторные тромбоэмболии легочной артерии с формированием инфаркт-пневмонии. Смерть больного наступила в возрасте 31 года от явлений застойной сердечной недостаточности. Семейный анамнез выявил, что мать больного умерла в возрасте 30 лет в связи с тяжелым заболеванием сердца, однако более точные данные клинического, инструментального и морфологического обследования отсутствуют. На момент смерти больного его 10-летняя дочь была здорова.

Пациент с мутацией IVS3+1G→A был впервые проконсультирован в возрасте 16 лет в связи с выявлением при скрининговом медицинском обследовании атриомегалии. Дополнительное эхокардиографическое исследование выявило утолщение стенок миокарда левого желудочка до 1,6 мм и выраженную

диастолическую дисфункцию. Клиническая картина заболевания была трактована как ГКМП; в течение 4 лет больной не получал терапии, жалоб не имел. В последующем отмечалось ремоделирование миокарда по рестриктивному типу, уменьшение толщины стенок левого желудочка, развитие застойной сердечной недостаточности и нарушений ритма и проводимости в виде АВ-блокады I-II степени и желудочковой тахикардии. При нейромиографии были обнаружены умеренные признаки дистальной миопатии. Пациенту был имплантирован кардиовертер-дефибриллятор. В дальнейшем в течение 5 лет отмечалось прогрессирующее снижение фракции выброса левого желудочка, увеличение размеров правого желудочка и формирование дилатационного фенотипа. Таким образом, у данного пациента особенностями клинической картины десминовой кардиомиопатии были трансформация различных морфологических вариантов кардиомиопатии (гипертрофического, рестриктивного, дилатационного) и слабо выраженный процесс миопатии.

Клиническая картина заболевания у пациента с ДКМП, вызванной A213V заменой гена десмина

Вторая мутация гена десмина, носящая точечный характер, была обнаружена у пожилого мужчины с поздней манифестацией ДКМП. У данного больного в возрасте 66 лет впервые появились признаки сердечной недостаточности в виде одышки и жалоб на снижение толерантности к физическим нагрузкам, что и послужило поводом для обследования. Известно, что в течение предыдущих 10 лет у больного наблюдалась артериальная гипертензия со стойко повышенными цифрами артериального

давления (160/90 мм рт.ст.) по причине низкой приверженности проводимой терапии. Обследование сердечно-сосудистой системы выявило выраженную дилатацию всех камер сердца и резкое снижение фракции выброса (19 %). Также были выявлены атриовентрикулярная блокада первой степени и блокада левой ножки пучка Гиса. Учитывая возраст больного и длительный анамнез высокой артериальной гипертензии, состояние больного было расценено как вторичная кардиомиопатия смешанного генеза вследствие ИБС и длительной артериальной гипертензии. В течение последующих двух лет у больного наблюдалось быстрое прогрессирование признаков сердечной недостаточности со значительным снижением переносимости физических нагрузок, развитие постоянной одышки в покое и появление эпизодов сердечной астмы. Суточное мониторирование ЭКГ выявило наличие клинически значимых суправентрикулярных и желудочковых экстрасистол, а также эпизодов желудочковой тахикардии. Эхокардиографические данные больного представлены в Таблице 2. Принимая во внимание быстрое прогрессирование сердечной недостаточности, отсутствие убедительных данных за наличие у больного ишемической болезни сердца (отсутствие изменений липидного спектра крови, стенокардии, инфаркта миокарда в анамнезе, признаков ишемии миокарда при суточном мониторировании ЭКГ и зон гипокинезии по данным эхокардиографии) повторное клиническое и инструментальное обследование привело к пересмотру изначально поставленного диагноза и верификации у больного первичной формы ДКМП. В последующем периоде у больного неоднократно наблюдались эпизоды эмболии сосудов головного мозга. Смерть больного наступила в возрасте 68 лет от явлений застойной сердечной недостаточности. Его трое взрослых детей не имели клинических признаков заболевания. Семейный анамнез выявил, что мать больного умерла в возрасте 56 лет от неуточненного заболевания сердца.

Учитывая обнаружение данной замены в 2 контрольных образцах, а также наличие ее в качестве редкого полиморфного варианта (MAF 1:200–4:200) в базах данных EVS и 100 Genomes, нами было проведено доаполнительное исследование структурных эффектов данной замены на внутриклеточную полимеризацию десминовых и виментиновых филаментов.

Функциональное исследование A213V десмина с помощью трансфекции клеточной линии HeLa

Двойное иммуногистохимическое окрашивание клеток HeLa после проведенной трансфекции

плазмидой, содержащей A213V десмин, выявило формирование четкой дискретной филаментозной сети десмина. В то же время плотность десминовых филаментов была меньшей, по сравнению с результатами трансфекции нормальным геном десмина (Рис. 2 А, Б). Значительных нарушений со стороны другого представителя промежуточных филаментов — виментина, с которым десмин способен к совместной полимеризации — после A213V трансфекции также обнаружено не было. Однако, распространение виментиновых филаментов после A213V трансфекций было незначительно меньшим по сравнению с контролем, что выражалось в отсутствии виментиновой сети в периферических отделах клетки (Рис. 2 В, Г).

Обсуждение полученных данных:

В данной работе проведено исследование ДНК пациентов с тремя основными типами кардиомиопатий — дилатационной (ДКМП), гипертрофической (ГКМП) и рестриктивной (РКМП) — с целью выявления возможных мутаций гена десмина. Необходимо сразу отметить малое число пациентов в группе рестриктивной кардиомиопатии, которое объясняется низкой частотой встречаемости данного заболевания. В подтверждение того факта, что рестриктивный фенотип описан среди случаев десминовой кардиомиопатии, в нашем исследовании была обнаружена мутация гена десмина даже среди небольшого числа пациентов с рестриктивной кардиомиопатией. В соответствии с последними данными литературы, большая часть случаев рестриктивной кардиомиопатии вызвана мутациями гена сердечного тропонина I [5]. Однако нам ранее удалось идентифицировать новую мутацию гена тропонина I только в одном из исследованных нами случаев [11]. Группа гипертрофической кардиомиопатии в нашей работе также была немногочисленной. По данным, опубликованным в 2003 году, приблизительно 60 % всех случаев гипертрофической кардиомиопатии вызваны мутациями уже известных генов — гена тяжелых цепей β -миозина и гена миозинсвязывающего белка С. Таким образом, только у 16 из 40 пациентов с гипертрофической кардиомиопатией можно ожидать выявление мутаций в других генах в качестве причины заболевания [12]. С другой стороны, в большинстве описанных случаев гипертрофической кардиомиопатии, сочетающейся с внутриклеточными включениями десмина, мутаций гена десмина обнаружено не было [13–15]. Это позволяет предположить, что даже при наличии внутриклеточной патологии распределения десмина причиной гипертрофической кардиомиопатии могут являться мутации других генов. Таким

образом, по результатам проведенного исследования можно сделать вывод о том, что мутации гена десмина не являются частой причиной развития гипертрофической кардиомиопатии и обуславливают менее 2,5 % случаев заболевания.

На сегодняшний день опубликованы данные трех исследований, в которых изучалась частота мутаций гена десмина в группе больных дилатационной кардиомиопатией. В первом исследовании, включавшем 41 пробанда и 22 спорадических случая, после скрининга всех девяти экзонов гена десмина мутаций обнаружено не было. Это позволило сделать вывод, что мутации гена десмина обуславливают возникновение менее 2,5 % семейных и менее 1,6 % всех случаев дилатационной кардиомиопатии [7]. Во второе исследование было включено 217 спорадических и 48 семейных случаев дилатационной кардиомиопатии и исследовался только 8-й экзон гена десмина [8]. В данном исследовании была обнаружена I451M мутация гена десмина, обуславливающая развитие 1,1 % всех случаев заболевания. Необходимо отметить, что важным ограничением данных исследований было применение метода конформационного полиморфизма (SSCP) для обнаружения мутаций, который, как известно, дает до 15 % ложноотрицательных результатов [16]. В связи с этим, значительным преимуществом нашего исследования было использование прямого метода секвенирования, который на сегодняшний день является наиболее достоверным способом выявления различных видов мутаций. Другим важным преимуществом нашей работы было включение в исследование всех экзонов гена десмина. Сходными же критериями включения обладало исследование М. Taylor и соавторов. Мы обнаружили три новых мутации гена десмина в группе как дилатационной,

так и рестриктивной кардиомиопатии. В целом это согласуется с данными литературы и полностью подтверждает гипотезу М. Taylor о том, что мутации гена десмина являются редкой причиной развития дилатационной кардиомиопатии. Все обнаруженные нами мутации затрагивают основной домен белка. Это противоречит ранее выдвинутой гипотезе о том, что патология миокарда связана с мутациями, затрагивающими структуру хвостового домена белка, в то время как мутации, затрагивающие основной домен белка, чаще приводят к развитию скелетной миопатии [2].

Общей чертой клинической картины заболевания в обоих описанных нами случаях были нарушения со стороны проводящей системы сердца. Вместе с остальными описанными в литературе случаями десминовой кардиомиопатии (Таблица 3) это служит аргументом в пользу того, что нарушения проводящей системы сердца являются наиболее постоянным и типичным признаком данного заболевания. Высокая степень экспрессии десмина в волокнах Пуркинье описана ранее [17]. Несмотря на то, что причина этого и точная функция десминовых филаментов в процессе электрического возбуждения неизвестны, представляется вероятным, что кардиомиоциты проводящей системы сердца наиболее чувствительны к патологии десмина.

Клиническая картина заболевания у первого пациента была представлена дилатационной кардиомиопатией с преимущественным вовлечением правого желудочка. Дилатация сердца не является обязательным симптомом при мутациях гена десмина. Как видно из Таблицы 3, среди опубликованных мутаций десмина, вызывающих повреждение миокарда, дилатационная кардиомиопатия наблюдалась наиболее часто. Интересно отметить, что другая

Таблица 3

МУТАЦИИ ГЕНА ДЕСМИНА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ КАРДИОМИОПАТИИ

Мутация	Проявления со стороны сердечно-сосудистой системы	Литературная ссылка
Δ 173-179	Не определены	[19]
A213V	РКМП	[20]
Ins 1bpX245	Аритмия, желудочковая тахикардия	[21]
Δ214-245	AV блок, ДКМП (правожелудочковая)	[22]
L345P	AV блок, ДКМП	[23]
A360P и A393I	AV блок, ДКМП	[10]
Δ 366	Дефекты AV проводимости	[24]
A337P	AV блок	[25]
L385P	AV блок, незначительная дилатация камер	[26]
A406T	AV блок, незначительная дилатация или РКМП	[22]
I451M	ДКМП	[2]
IVS2-1g→a	ДКМП (правожелудочковая)	[18]
IVS3+3a→g	AV блок	[18]

сплайсинговая мутация гена десмина, затрагивающая акцепторный участок второго интрона и описанная К. Park и М. Dalakas, также приводит к преимущественной дилатации правого желудочка, в то время как сплайсинговая мутация, затрагивающая донорный участок третьего интрона, описанная теми же авторами, такого эффекта не имеет [18]. Все три описанные сплайсинговые мутации ведут к потере третьего экзона. Является ли тот факт, что именно мутации гена десмина, затрагивающие акцепторный участок второго интрона, ассоциированы с дилатацией правого желудочка, случайным совпадением или имеет патогенетическое значение, на сегодняшний момент неясно.

Другой особенностью клинической картины в первом случае является ранняя манифестация дилатационной кардиомиопатии и появление первых признаков заболевания в возрасте 19 лет. По сравнению с остальными случаями сплайсинговых мутаций гена десмина это — наиболее раннее начало заболевания. Важно отметить, что у пациента отсутствовали мышечные симптомы и не наблюдалось повышенного уровня креатинкиназы на протяжении всего заболевания. Несмотря на то, что отсутствие симптомов со стороны скелетных мышц является нетипичным для мутаций гена десмина, в данном случае оно может объясняться ранней гибелью пациента от дилатационной кардиомиопатии — до начала мышечных проявлений заболевания. Это согласуется с уже опубликованными данными о том, что начало мышечных симптомов в случае сплайсинговых мутаций гена десмина приходится на пятую декаду жизни [18].

В данной работе нами впервые описана трансформация морфологических фенотипов КМП, наблюдаемая в случае второй сплайсинговой мутации. Данную особенность клинической картины и течения десминовых кардиомиопатий необходимо учитывать при сборе анамнеза заболевания и анализе данных функциональных исследований, полученных ранее.

Клиническая картина заболевания у пациента с A213V мутацией гена десмина значительно отличается от всех ранее описанных случаев десминовой кардиомиопатии. В данном случае кардиомегалия и сердечная недостаточность развились у больного только в возрасте 66 лет. Однако после появления первых признаков заболевания отмечалось быстрое прогрессирование симптомов сердечной недостаточности и декомпенсация сердечной деятельности. Несмотря на то, что электромиография в данном случае проведена не была, мы предполагаем, что признаки скелетной миопатии в данном случае либо отсутствовали, либо были выражены минимально,

учитывая отсутствие симптомов со стороны скелетных мышц и нормальный уровень креатинкиназы вплоть до смерти больного. Таким образом, уникальность данного случая заболевания заключается в нетипичном для мутаций гена десмина позднем развитии дилатационной кардиомиопатии без признаков миопатии. Еще более интересным является тот факт, что данная мутация была описана в двух других случаях. В первом из них она приводила к развитию рестриктивной кардиомиопатии [20], а во втором — к дистальной миопатии без признаков кардиомиопатии (Goldfarb, Vicart et al. 2004). На сегодняшний день это единственный известный нам из литературы пример, когда одна и та же мутация приводит к развитию трех различных фенотипов заболевания, в то время как в двух первых случаях клиническим проявлением мутации являлось развитие кардиомиопатии (дилатационной или рестриктивной), а в третьем единственным проявлением заболевания являлась скелетная миопатия. Это наблюдение позволило сделать вывод, что, помимо собственно мутации гена, приводящей к замене определенной аминокислоты, ряд других факторов, таких как сочетание полиморфизмов различных генов и/или факторы окружающей среды могут играть критическую роль в фенотипическом проявлении A213V замены гена десмина [27].

Необходимо особо отметить тот факт, что в данном исследовании A213V замена гена десмина была обнаружена у двух практически здоровых индивидуумов из группы контроля. Это привело к возникновению гипотезы о том, что данная аминокислотная замена может представлять собой полиморфизм, предрасполагающий к патологическому ремоделированию миокарда в присутствии неблагоприятных факторов. В случае описываемого пациента роль такого фактора могла играть длительная артериальная гипертензия. Экспериментальные данные, полученные ранее другими авторами при исследовании A213V мутации гена десмина, противоречивы. В нашей работе с помощью трансфекций клеток линии HeLa было показано, что A213V десмин способен к формированию филаментозной сети, однако более низкой, чем в норме, плотности. Нам не удалось выявить внутриклеточные десминовые агрегаты, которые часто наблюдаются в случаях мутаций гена десмина и, как считается, обуславливают патогенный эффект [28]. Наши данные согласуются с результатами N. Bowles и соавторов [20], полученными на культуре миобластов. Ими также показано формирование аномальной сети десминовых филаментов, нарушение сети актиновых филаментов и отсутствие десминовых агрегатов в случае A213V мутации [28]. Исследо-

вания, проведенные *in vitro*, показали нормальный процесс полимеризации A213V десмина и увеличение плотности A213V десминовых филаментов в растворе. Несмотря на полученные нами и другими исследователями экспериментальные данные об A213V мутации гена десмина, для окончательного определения патогенности данной мутации необходимо проведение дальнейших исследований.

Таким образом, в нашей работе больные тремя типами кардиомиопатий — гипертрофической, дилатационной и рестриктивной — были обследованы на предмет возможного наличия мутаций гена десмина. Было обнаружено, что мутации гена десмина обуславливают развитие приблизительно 2% дилатационных кардиомиопатий. Наиболее типичными клиническими симптомами кардиомиопатии, вызванной мутациями гена десмина, являются нарушения ритма и проводимости, а также развитие дилатации правого желудочка. Полученные нами данные, а также данные литературы, позволяют сделать вывод о том, что клиническая картина мутаций гена десмина может варьировать в зависимости от степени вовлечения сердечной и скелетной мускулатуры. Сопутствующие генетические факторы и факторы окружающей среды также могут влиять на клинические проявления десминопатий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, соглашение № 14–15–00745.

Литература

1. *Towbin J.A., Hejtmanick J.F., Brink P. et al.* X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus // *Circulation*. — 1993. — Vol. 87, № 6. — P. 1854–1865.
2. *Li D., Tapscoft T., Gonzalez O. et al.* Desmin mutation responsible for idiopathic dilated cardiomyopathy // *Circulation*. — 1999. — Vol. 100, № 5. — P. 461–464.
3. *Bonne G., Di Barletta M.R., Varnous S. et al.* Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy // *Nat. Genet.* — 1999. — Vol. 21, № 3. — P. 285–288.
4. *Sanna T., Dello Russo A., Toniolo D. et al.* Cardiac features of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutations // *Eur. Heart J.* — 2003. — Vol. 24, № 24. — P. 2227–2236.
5. *Mogensen J., Kubo T., Duque M. et al.* Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations // *J. Clin. Invest.* — 2003. — Vol. 111, № 2. — P. 209–216.
6. *Goldfarb L.G., Vicart P., Goebel H.H., Dalakas M.C.* Desmin myopathy // *Brain*. — 2004. — Vol. 127, Pt. 4. — P. 723–734.
7. *Tesson F., Sylvius N., Pilotto A. et al.* Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a European population of dilated cardiomyopathy // *Eur. Heart J.* — 2000. — Vol. 21, № 22. — P. 1872–1876.
8. *Miyamoto Y., Akita H., Shiga N. et al.* Frequency and clinical characteristics of dilated cardiomyopathy caused by desmin gene mutation in a Japanese population // *Eur. Heart J.* — 2001. — Vol. 22, № 24. — P. 2284–2289.
9. *Vicart P., Dupret J.M., Hazan J. et al.* Human desmin gene: cDNA sequence, regional localization and exclusion of the locus in a familial desmin-related myopathy // *Hum. Genet.* — 1996. — Vol. 98, № 4. — P. 422–429.
10. *Goldfarb L.G., Park K.Y., Cervenakova L. et al.* Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy // *Nat. Genet.* — 1998. — Vol. 19, № 4. — P. 402–403.
11. *Ющенко М.В., Новик Г.А., Костарева А.А., Гудкова А.Я.* Особенности течения кардиомиопатий, обусловленных мутациями гена тропонина I // *Артериальная гипертензия*. — 2009. — Т. 15, № 5. — С. 648–651.
12. *Richard P., Charron P., Carrier L. et al.* Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy // *Circulation*. — 2003. — Vol. 107, № 17. — P. 2227–2232.
13. *Muntoni F., Catani G., Mateddu A. et al.* Familial cardiomyopathy, mental retardation and myopathy associated with desmin-type intermediate filaments // *Neuromuscul. Disord.* — 1994. — Vol. 4, № 3. — P. 233–241.
14. *Porcu M., Muntoni F., Catani G., Mereu D.* Familial cardiac and skeletal myopathy associated with desmin accumulation // *Clin. Cardiol.* — 1994. — Vol. 17, № 5. — P. 277–279.
15. *Olive M., Goldfarb L., Moreno D. et al.* Desmin-related myopathy: clinical, electrophysiological, radiological, neuropathological and genetic studies // *J. Neurol. Sci.* — 2004. — Vol. 219, № 1–2. — P. 125–137.
16. *Osterziel K.J., Perrot A.* Dilated cardiomyopathy: more genes means more phenotypes // *Eur. Heart J.* — 2005. — Vol. 26, № 8. — P. 751–754.
17. *Thornell L.E., Eriksson A.* Filament systems in the Purkinje fibers of the heart // *Am. J. Physiol.* — 1981. — Vol. 241, № 3. — P. H291–305.
18. *Park K.Y., Dalakas M.C., Goebel H.H. et al.* Desmin splice variants causing cardiac and skeletal myopathy // *J. Med. Genet.* — 2000. — Vol. 37, № 11. — P. 851–857.
19. *Munoz-Marmol A.M., Strasser G., Isamat M. et al.* A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — Vol. 95, № 19. — P. 11312–11317.
20. *Bowles N.J.S., Vatta M., Chrisco M. et al.* Familial restrictive cardiomyopathy caused by missense mutation in the desmin gene. // *Pediatric Research*. — 2002. — Vol. 51, Suppl. 2.
21. *Schroder R., Goudeau B., Simon M.C. et al.* On noxious desmin: functional effects of a novel heterozygous desmin insertion mutation on the extrasarcomeric desmin cytoskeleton and mitochondria // *Hum. Mol. Genet.* — 2003. — Vol. 12, № 6. — P. 657–669.

22. *Park K.Y., Dalakas M.C., Semino-Mora C. et al.* Sporadic cardiac and skeletal myopathy caused by a de novo desmin mutation // *Clin. Genet.* — 2000. — Vol. 57, № 6. — P. 423–429.

23. *Sjoberg G., Saavedra-Matiz C.A., Rosen D.R. et al.* A missense mutation in the desmin rod domain is associated with autosomal dominant distal myopathy, and exerts a dominant negative effect on filament formation // *Hum. Mol. Genet.* — 1999. — Vol. 8, № 12. — P. 2191–2198.

24. *Kaminska A., Strelkov S.V., Goudeau B. et al.* Small deletions disturb desmin architecture leading to breakdown of muscle cells and development of skeletal or cardioskeletal myopathy // *Hum. Genet.* — 2004. — Vol. 114, № 3. — P. 306–313.

25. *Dalakas M.C., Park K.Y., Semino-Mora C. et al.* Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene // *N. Engl. J. Med.* — 2000. — Vol. 342, № 11. — P. 770–780.

26. *Sugawara M., Kato K., Komatsu M. et al.* A novel de novo mutation in the desmin gene causes desmin myopathy with toxic aggregates // *Neurology.* — 2000. — Vol. 55, № 7. — P. 986–990.

27. *Kostareva A., Sjoberg G., Gudkova A. et al.* Desmin A213V substitution represents a rare polymorphism but not a mutation and is more prevalent in patients with heart dilation of various origins // *Acta Myol.* — 2011. — Vol. 30, № 1. — P. 42–45.

28. *Смолина Н.А., Щукина И. А., Карпушев А.В. и др.* Сравнительная оценка методов получения функционально активных дифференцированных мышечных клеток // *Цитология.* — 2014. — Т. 56, № 4. — С. 291–299.