

Получена: 25 мая 2020 / Принята: 19 июля 2020 / Опубликовано online: 31 августа 2020

DOI 10.34689/SH.2020.22.4.06

УДК 616.12

## ПАТОГЕННЫЕ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *hRYR2* У КАЗАХСТАНСКИХ ПАЦИЕНТОВ С ЖЕЛУДОЧКОВОЙ ТАХИКАРДИЕЙ

**Жаннур М. Абилова**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-9671-4574>

**Кристиан Гули**<sup>2</sup>,

**Махаббат С. Бекбосынова**<sup>3</sup>,

**Айнур Ж. Ахметова**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-5557-3338>

**Сауле Е. Рахимова**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8245-2400>

**Айнур Р. Акильжанова**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355>

<sup>1</sup> Центр наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев университет, г. Нур-Султан, Республика Казахстан;

<sup>2</sup> Центр медицинских исследований, Медицинский университет г. Грац, г. Грац, Австрия;

<sup>3</sup> Национальный научный кардиохирургический центр, г. Нур-Султан, Республика Казахстан.

### Резюме

**Введение.** Желудочковая тахикардия (ЖТ) является ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире, что приводит к внезапной сердечной смерти и делает это серьезной проблемой общественного здравоохранения. В настоящее время выявлены ассоциации ЖТ с мутациями в гене *hRYR2*, участвующим в процессе высвобождения кальция в кардиомиоцитах. В связи с этим представляет несомненный интерес изучение вклада генетических вариаций гена *hRYR2* в формировании предрасположенности к ЖТ среди населения Казахстана.

**Цель исследования:** изучить мутации в гене *hRYR2* у пациентов с желудочковой тахикардией и членов их семей.

**Материалы и методы.** Когортное исследование. Проведен скрининг генетических вариантов гена *hRYR2* у 35 пациентов ЖТ, из них 2 с катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардией (КПТЖ) и 33 пациентов с идиопатической ЖТ. При обнаружении мутаций генетический анализ был проведен и для родственников пациента, у которых были выявлены мутации. Целевые области гена *hRYR2*, в том числе наиболее важные 45 экзонов, амплифицировали с помощью ПЦР и непосредственно секвенировали на генетическом анализаторе DNA analyser 3730xL. Анализ данных проводился с использованием программ SeqScape 2.7, SeqAnalysis 2.5 и др. Проводились исследования генетических вариантов, частоты аллелей. Частоты аллелей и генотипов сравнивались между пациентами, их родственниками и группой контроля. Применяли *in silico* модели для предсказания клинической значимости генетического варианта.

**Результаты.** Выявлены новые мутации у пациента с КПТЖ (с.А13892Т; р.Д4631V) и у одного пациента с ЖТ (с.С5428С; р.V1810L). Оба варианта находятся в филогенетически консервативных регионах гена *hRYR2* и являются клинически значимыми, патологическими. Также у одного пациента с ЖТ была обнаружена мутация с.С7511Т (р.Т2504М), ранее ассоциированная с аритмогенной дисплазией правого желудочка (АДПЖ). Данный вариант находится в филогенетически консервативном регионе гена *hRYR2* и является также патологическим (балл по MutationTaster D (0.99) и по PolyPhenII D (0.99)).

**Выводы.** Скрининг мутаций в гене сердечного рецептора рианодина типа 2 *hRYR2* у пациентов с ЖТ выявил клинически значимые мутации, что позволило скорректировать тактику лечения данных пациентов, и предложить скрининг данных вариантов у ближайших родственников. Данное исследование будет полезно для казахстанских пациентов с желудочковыми нарушениями ритма в оценке необходимости генетического скрининга и надежной генетической консультации для прогнозирования и профилактики внезапной сердечной смерти и дифференциальной диагностики аритмии.

**Ключевые слова:** аритмия, желудочковая тахикардия, катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия, *hRYR2*, ген сердечного рецептора рианодина типа 2, секвенирование, мутация.

Abstract

**PATHOGENIC MUTATIONS IN *HRYR2* GENE OF KAZAKHSTANI PATIENTS WITH VENTRICULAR TACHYCARDIA****Zhannur M. Abilova**<sup>1\*</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-9671-4574>**Christian Gully**<sup>2</sup>, **Makhabbat S. Bekbosynova**<sup>3</sup>,**Ainur Zh. Akhmetova**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-5557-3338>**Saule Y. Rakhimova**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8245-2400>**Ainur R. Akilzhanova**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355><sup>1</sup> Center for Life Science, «National Laboratory Astana, Nazarbayev University, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan;<sup>2</sup> Medical Research Center, Medical University of Graz, Graz, Austria;<sup>3</sup> National Research Cardiac Surgery, Nur-Sultan city, Republic of Kazakhstan.

**Introduction:** Ventricular tachycardia (VT) is the key factor of morbidity and mortality worldwide, resulting in sudden cardiac death and making it challenging issue within public health. Currently, VT associations with mutations in the hRYR2 gene involved in the process of calcium release in cardiomyocytes were identified. Hence it is highly important to study the contribution of genetic variations of the hRYR2 gene for formation of susceptibility to VT among the population of Kazakhstan.

**Purpose:** to study mutations in the hRYR2 gene in patients with ventricular tachycardia and their family members.

**Materials and methods:** This study was designed as a cohort study. Genetic variants of the hRYR2 gene were screened in 35 VT patients, 2 of them with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) and 33 patients with idiopathic VT. When mutations were detected, the genetic analysis was also performed for the patient's relatives with mutations identified. The target regions of the hRYR2 gene, including the most important 45 exons, were amplified by PCR and directly sequenced using the DNA analyser 3730xL.

Data analysis was carried out using the programs SeqScape 2.7, SeqAnalysis 2.5, etc. Statistical calculations - studies of genetic variants and allele frequencies were carried out. Allele and genotype frequencies were compared between patients, their relatives and control groups, and in silico models were used to predict the clinical significance of a genetic variant.

**Outcomes:** New mutations were found in a patient with CPVT (c.A13892T; p.D4631V) and in one patient with VT (c.G5428C; p.V1810L). Both variants are located in phylogenetically conserved regions of the hRYR2 gene and they are clinically significant, pathological. In addition, c.C7511T mutation (p.T2504M) was found in one patient with VT previously associated with arrhythmogenic right ventricular dysplasia (ARVD). This variant is located in the phylogenetically conserved region of the hRYR2 gene and is also pathological (score according to MutationTaster D (0.99) and PolyPhenII D (0.99)).

**Conclusions:** Screening for mutations in cardiac ryanodine receptor gene hRYR2 type 2 in patients with VT has revealed clinically significant mutations, which made it possible to improve the treatment of these patients and offer the screening of these variants in close relatives. This research will be useful for Kazakhstani patients with ventricular arrhythmias in assessment of required genetic screening and reliable genetic counseling in order to predict and prevent the sudden cardiac death and differential diagnosis of arrhythmia.

**Key words:** *arrhythmia, ventricular tachycardia, catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia, hRYR2, cardiac ryanodine receptor gene type 2, sequencing, mutation.*

Түйіндеме

**ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ҚАРЫНША АРИТМИЯСЫ БАР ЕМДЕЛУШІЛЕРДЕ  
*HRYR2* ГЕНІНІҢ ПАТОГЕНДІ МУТАЦИЯЛАРЫ****Жаннұр М. Абилова**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0001-9671-4574>**Кристиан Гули**<sup>2</sup>, **Махаббат. С. Бекбосынова**<sup>3</sup>,**Айнұр Ж. Ахметова**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0002-5557-3338>**Сәуле Е. Рахимова**<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-8245-2400>**Айнұр Р. Акильжанова**<sup>1</sup>, <http://orcid.org/0000-0001-6161-8355><sup>1</sup> Өмір туралы ғылымдар орталығы, National Laboratory Astana, Назарбаев Университеті, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы<sup>2</sup> Медициналық зерттеу орталығы, Грац қаласының Медициналық Университеті, Грац қ., Австрия;<sup>3</sup> Ұлттық ғылыми кардиохирургиялық орталығы, Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан Республикасы.

**Кіріспе.** Қарынша аритмиясы бүкіл әлемде сырқаттанушылық пен өлім-жітімнің басты себебі болып табылады, бұл кенеттен жүрек өліміне әкеліп соғады және ол қоғамдық денсаулық мәселесі болып табылады. Әдеби мәліметтер негізінде қазіргі уақытта қарыншықты аритмия зерттеу кезінде ағзадағы кальцийді босату процесіне

қатысатын *hRYR2* генімен байланысы анықталды. Осыған байланысты Қазақстан халқының арасында қарыншықты аритмияға *hRYR2* генінің генетикалық вариациясының бейімділігін қалыптастыруға қосқан үлесін зерттеуге қызығушылық тудырып отыр.

**Мақсаты:** қарыншалық тахикардиямен ауыратын науқастарда және олардың отбасыларында *hRYR2* геніндегі мутацияны зерттеу.

**Материалдар мен әдістер.** Бұл зерттеу когорттық зерттеу ретінде жасалған. *hRYR2* генінің генетикалық нұсқалары 35 ҚТ бар пациентінде тексерілді, олардың 2 катехоламинергиялық полиморфты қарыншалық тахикардиямен (КПҚТ) және идиопатиялық ҚТ бар 33 пациентте зерттелінді. Мутация анықталған кезде пациенттің туыстарына генетикалық талдау жасалды. *hRYR2* генінің мақсатты аймақтары, ең маңызды 45 экзон, ПТР әдісімен амплификацияны іске асырдық, DNA analyser 3730xL анализаторы көмегімен севенделді.

Мәліметтерді талдау SeqScape 2.7, SeqAnalysis 2.5 және т.б. бағдарламалардың көмегімен жүзеге асырылды. Статистикалық есептеулер - генетикалық варианттарды, аллельді жиіліктерді зерттеу жүргізілді. Аллель және генотип жиіліктері пациенттер, олардың туыстары және бақылау тобы арасында салыстырылды, силикондық модельдерде генетикалық нұсқаның клиникалық маңыздылығын болжау үшін пайдаланылды.

**Нәтижелер.** Жаңа мутациялар КПҚЖ бар науқаста (с.А13892Т; р.Д4631V) және ҚТ бар пациентте (с.С5428С; р.В1810L) анықталды. Екі нұсқа да *hRYR2* генінің филогенетикалық тұрғыдан сақталған аймақтарында орналасқан және клиникалық тұрғыдан патологиялық маңызды. Сондай-ақ, ҚТ бар бір науқаста с.С7511Т мутациясы (р.Т2504М) алғашында әртүрлі зерттеулерде оң қарыншаның аритмогендік дисплазиясымен байланысқаны анықталды. Бұл нұсқа филогенетикалық тұрғыдан *hRYR2* генінің аймағында орналасқан және сонымен қатар патологиялық болып табылады (MutationTaster D (0.99) және PolyPhenII D (0.99) бойынша балл).

**Қорытынды.** ҚТ бар пациенттерде 2 типті жүрек рецепторлары рианодин геніндегі *hRYR2* мутацияларын скрининг арқылы клиникалық маңызды мутацияны анықтады, бұл пациенттердің емдеу тактикасын түзетуге және жақын туыстарына осы нұсқаларды скринингті ұсынуға мүмкіндік берді. Бұл зерттеу қарыншалық аритмиямен ауыратын қазақстандық пациенттерге генетикалық скринингтің қажеттілігін бағалауда және сенімді генетикалық кеңес беру кезінде кенеттен жүрек өлімін алдын-алу және аритмияның дифференциалды диагнозын болдырмау үшін пайдалы болады.

**Түйінді сөздер:** аритмия, қарыншалық тахикардия, катехоламинергиялық полиморфты қарыншалық тахикардия, *hRYR2*, 2 типті жүрек рианодин рецепторлары, секвенирлеу, мутация.

#### Библиографическая ссылка:

Абилова Ж.М., Гули К., Бекбосынова М.С., Ахметова А.Ж., Рахимова С.Е., Акильжанова А.Р. Патогенные мутации в гене *hRYR2* у казахстанских пациентов с желудочковой тахикардией // Наука и Здравоохранение. 2020. 4 (Т.22). С. 60-70. doi 10.34689/SH.2020.22.4.06

Abilova Zh.M., Gully Ch., Bekbosynova M.S., Akhmetova A.Zh., Rakhimova S.Y., Akilzhanova A.R. Pathogenic mutations in *hRYR2* gene of kazakhstani patients with ventricular tachycardia // Nauka i Zdravookhranenie [Science & Healthcare]. 2020, (Vol.22) 4, pp. 60-70. doi 10.34689/SH.2020.22.4.06

Абилова Ж.М., Гули К., Бекбосынова М.С., Ахметова А.Ж., Рахимова С.Е., Акильжанова А.Р. Қазақстандағы қарынша аритмиясы бар емделушілерде *hRYR2* генінің патогенді мутациялары // Ғылым және Денсаулық сақтау. 2020. 4 (Т.22). Б. 60-70. doi 10.34689/SH.2020.22.4.06

#### Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы, по-прежнему, остаются ведущей причиной смертности во многих странах мира. Ежегодно в мире от заболеваний сердечно-сосудистой системы умирают 17 млн человек., в том числе от внезапной сердечной смерти (ВСС). Внезапная сердечная смерть (ВСС) – это ненасильственная смерть, характеризующаяся внезапной потерей сознания в течение одного часа от момента появления острых симптомов. ВСС является наиболее актуальной проблемой в наше время. В странах Европы ежедневно умирает около 2500 человек [11, 23]. По данным НИИ кардиологии и внутренних болезней РК, показатель смертности от болезней системы кровообращения в нашей стране уже достиг ужасающей цифры - 535 случаев на 100 тысяч человек населения. В республике зарегистрировано почти два миллиона человек, страдающих сердечно-сосудистыми

заболеваниями [1].

Механизм развития ВСС в большинстве случаев связан с неритмичными очень частыми сокращениями желудочков, в остальных случаях - с брадиаритмией (редкое неритмичное сокращение сердца) и асистолией (остановка сердца) (Рисунок 1). Желудочковые аритмии часто встречаются в молодом возрасте при структурно неизменном сердце и у пожилых людей, их частота возрастает при наличии структурного заболевания сердца, встречаясь у 70–80% людей старше 60 лет [2, 7, 13, 18, 25]

Желудочковые аритмии являются ведущей причиной заболеваемости и смертности во всем мире, что приводит к ВСС и делает это серьезной проблемой общественного здравоохранения. Катехоламинергическая полиморфная желудочковая тахикардия (КПТЖ) является клинически и генетически гетерогенным заболеванием, проявляется за

пределами детского возраста спектром полиморфных аритмий. Несколько факторов определяют КППЖ:

а) более двух морфологических типов желудочковой тахикардии, индуцируемых физической нагрузкой либо инфузией катехоламинов, в более чем трех последовательных сердечных циклах;

б) отсутствие электролитного дисбаланса, медикаментозного лечения, органического заболевания сердца (кардиомиопатия, ИБС, врожденные заболевания сердца), являющихся причинами аритмии;

в) отсутствие первичного нарушения проводимости, таких как пролонгированный QT синдром или синдром Бругада. Генетическая основа болезни была выявлена при определении сцепленности заболевания с хромосомным регионом 1q42 в гене сердечного рецептора рианоидина типа 2 (ryanodine type 2 receptor (RYR2) [14]. Ген *hRYR2* локализованный в 1q42, кодирует сердечный рецептор рианоидина, который является основным каналом высвобождения кальция в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов [15].

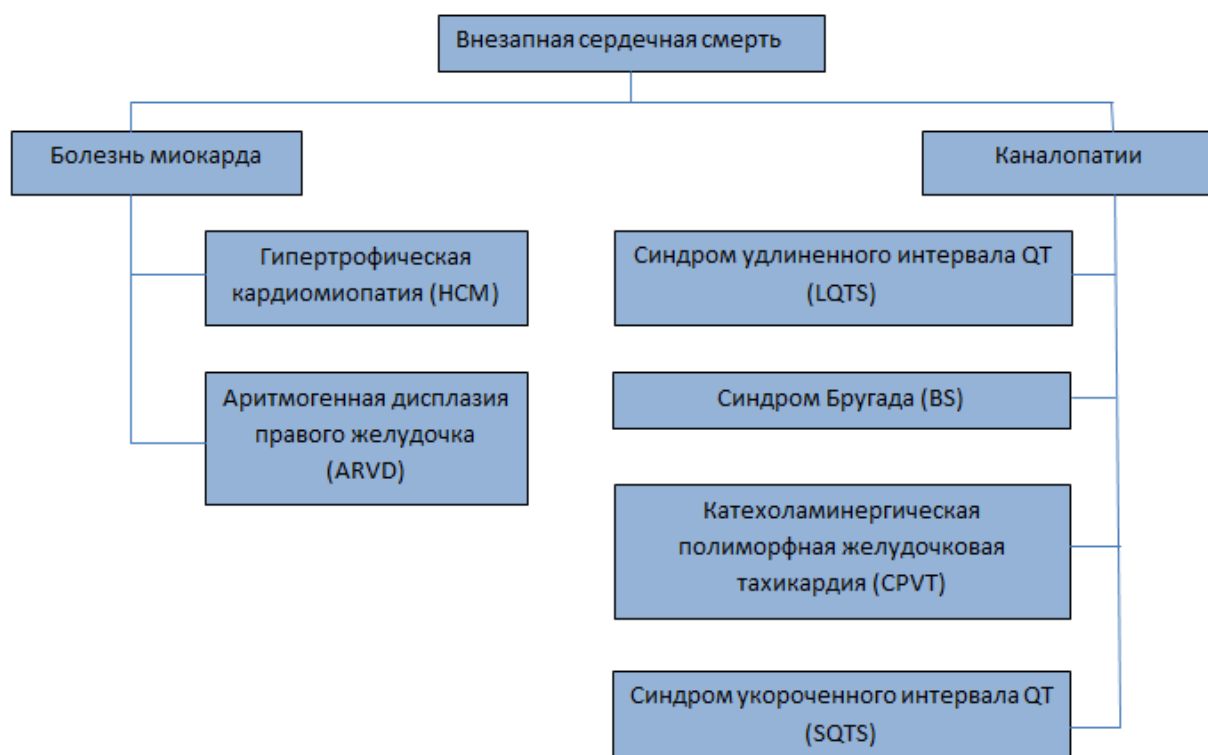


Рисунок 1. Генетические причины возникновения внезапной сердечной смерти.

(Figure 1. Genetic causes of sudden cardiac death.).

Анализ литературных данных показывает, что в настоящее время при изучении ЖТ выявлены достоверные ассоциации с геном *hRYR2*, участвующими в процессе высвобождения кальция в клетках. Однако исследования различаются по дизайну, они проводились на различных популяциях [6, 10, 24].

В связи с этим представляет несомненный интерес изучение вклада генетических вариаций гена *hRYR2* в формировании предрасположенности к ЖТ среди населения Казахстана.

**Цель работы** – изучить мутации в гене *hRYR2* у пациентов с желудочковой тахикардией и членов их семей.

**Материалы и методы исследования**

Дизайн исследования: candidate gene study in consecutive case series – исследование гена-кандидата в серии последовательных случаев. Материалами исследования стали 35 больных с желудочковой тахикардией, диагностированных и лечившихся в Национальном научном кардиохирургическом центре (ННКЦ) г. Нур-Султана, и их ближайшие родственники за период с августа 2011 года по декабрь 2012 года. Контрольную группу составили 96 человек, рекрутированные в исследование из общей популяции

г. Нур-Султан, сопоставимые по полу, возрасту, этнической принадлежности. Всем участникам объяснялись цель и задачи планируемого исследования. После получения информированного согласия производился забор образцов биологического материала (кровь). Карты участника исследования включали паспортные данные, вопросы факторов риска, наследственный (семейный) анамнез. Заполнение карт осуществлялось врачом-кардиологом после интервьюирования пациента, информация о диагнозе и данных операции получены из Медицинских карт стационарного больного (Истории болезни). Этническое распределение группы пациентов составило 54,3% (19/35) казахи, 34,3% (12/35) русские и 11,4% другие.

Для выделения ДНК из цельной крови был использован набор QAIGEN blood DNA mini kit (QAIGEN, Германия) с модификацией протокола выделения ДНК. Количественно концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Qubit 2.0 (Invitrogen, США), Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Качественный анализ проводили на 1,5 % агарозном геле.

Для исследования мутаций гена hRYR2 были отобраны 45 экзонов, в которых наиболее часто встречались мутации, ассоциированные с развитием ЖТ в предыдущих исследованиях [9, 16]. Данные экзоны кодируют критические функциональные и регуляторные области белка гена hRYR2 кальциевого канала (3, 8, 10, 12-15, 17, 19, 21, 26-28, 37, 40-50, 75, 83, 86-93, 95-97, 99 [9, 16, 26]. ПЦР проводили на программируемом термостате BIO RAD (Applied Biosystems, США). Мы использовали 20 нг ДНК на ПЦР в общем объеме 20 мкл с использованием полимеразы Hot Start Plus (QIAGEN, Hilden, Germany) и установки реакции с четырьмя праймерами. Набор праймеров включал 1 мкл 10 пмоль M13 прямого меченого геноспецифичного прямого и M13 обратного меченого геноспецифичного обратного праймера. Дизайн праймеров был проведен на основе опубликованных последовательностей праймеров [12, 13, 16, 17] и обновлен в соответствии с последней записью в db для гена hRYR2 (ENSG00000198626; из выпуска базы данных ENSEMBL GRCh37). Для всех ампликонов использовались одинаковые стандартные условия циклирования ПЦР: Амплификацию проводили по следующей программе: один цикл 12 мин. при 96°C; 35 циклов, состоящих из следующих ступеней – 45 сек. при 95°C, 30 сек. при 57°C и 30 сек. при 72°C; и в заключение 1 цикл 10 мин. при 72°C. По завершении программы амплификации, 5 мкл результат каждой ПЦР проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле. Продукты ПЦР очищали с использованием смеси экзонуклеазы и щелочной фосфатазы. Реакции секвенирования проводили с использованием набора BigDye Terminator v.3.1. и праймеров прямого или обратного секвенирования M13 в соответствии со стандартными условиями циклирования. После очистки сиквенс продукт секвенировали на секвенаторе DNA

analyzer 3730 xL (Life Technologies). Анализ последовательности проводился как в электронном виде (DNASar, Lasergene, SeqMan Tool) с порогом обнаружения SNP, установленным на 35%, так и вручную. В качестве эталонной последовательности гена RYR2 человека использовалась запись GenBank NM\_001035.

При обнаружении мутаций в экзонах гена hRYR2 у пациентов с ЖТ генетический анализ был проведен и для родственников пациента, у которого выявлены были мутации, а также в контрольной популяционной группе.

Анализ нуклеотидных последовательностей генов или их отдельных фрагментов проводили с помощью различных пакетов компьютерных программ, таких как SeqScape 2.5, BLAST. Проверка найденных изменений нуклеотидной последовательности проводилась с использованием баз данных: The Human Gene Mutation Database [22], National Center for Biotechnology dbSNP database [21]. Оценка патогенности ранее неописанных миссенс-мутаций выполнялись с использованием ресурсов PolyPhen-2 [3, 4] и Mutation Taster [19, 20].

#### Результаты исследования

Выявлены 2 новые мутации в гене hRYR2 у пациента № 239 (с.А13892Т; р.Д4631V) и у пациента № 271 (с.Г5428С; р.V1810L). Оба варианта находятся в филогенетически консервативных регионах гена RYR2 и являются патологическими. Также была обнаружена мутация (с.С7511Т; р.Т2504М) у больного №444, ранее известная и ассоциированная с развитием аритмогенной дисплазией правого желудочка – ARVD (АДПЖ) [3, 16, 17].

В таблице 1 представлены основные характеристики и предикция выявленных генетических вариантов по 5 алгоритмам у пациентов с ЖТ в нашем исследовании.

Таблица 1.

#### Генетические варианты в гене hRYR2, выявленные у пациентов с желудочковой тахикардией.

(Genetic variants in the hRYR2 gene identified in patients with ventricular tachycardia).

Замена аминокислоты	Замена нуклеотида	SIFT Score	Poly-phen	Mutation Taster	Grantha m Score	Conservation	Базы данных ESP6500/1000G/КазКНТ	Семейный анамнез, наследование	Клиническое значение (B<3, 3≤VUS<5, D≥5) классификация
T2504M	с.С7511Т	D (0.01)	D (0.99)	D (0.99)	B (82)	Conserved (D)	отр/отр/отр HGMD, CM010424	неизвестно	D
V1810L	с.Г5428С	D (0.03)	B (0.24)	D (0.98)	B (32)	Conserved (D)	отр/отр/отр	наследственный; нет случаев ВСС, СС в анамнезе	VUS
D4631V	с.А13892Т	D (0.0)	D (0.99)	D (0.99)	D (152)	Conserved (D)	отр/отр/отр	De-novo; новая мутация, нет случаев ВСС, СС в анамнезе	D

\*D: Damaging- повреждающий,

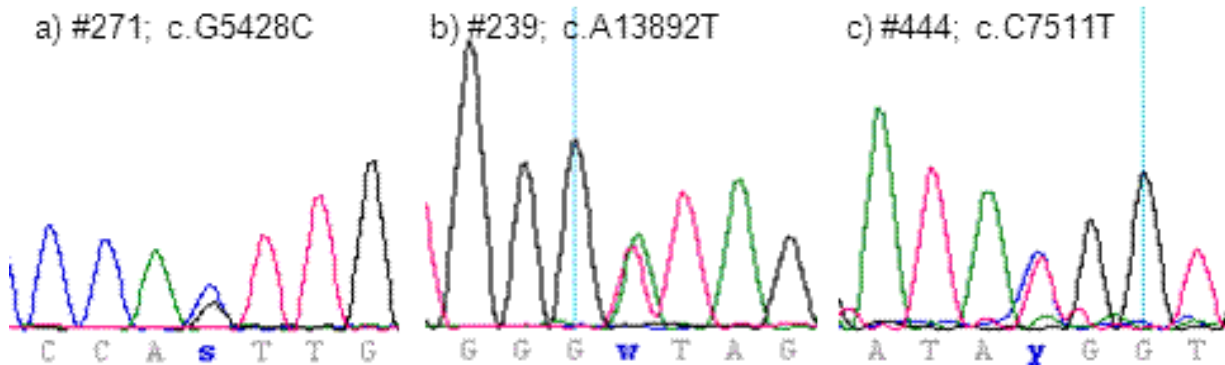
VUS: Variant of Unknown Significance, вариант неопределенной значимости,

B: Benign, благоприятный,

ВСС, внезапная сердечная смерть,

СС, сердечная смерть.

На рисунке 2 представлены электрофореграммы последовательности гена hRYR2 с обнаруженными мутациями (рисунок 2.).



**Рисунок 2. Электрофореграммы последовательности гена RYR2 с обнаруженными мутациями у пациентов #271- а, #239 - б, и #444 с.**

(Figure 2. Electropherograms of the RYR2 gene sequence with detected mutations in patients # 271-a, # 239-b, and # 444 c.).

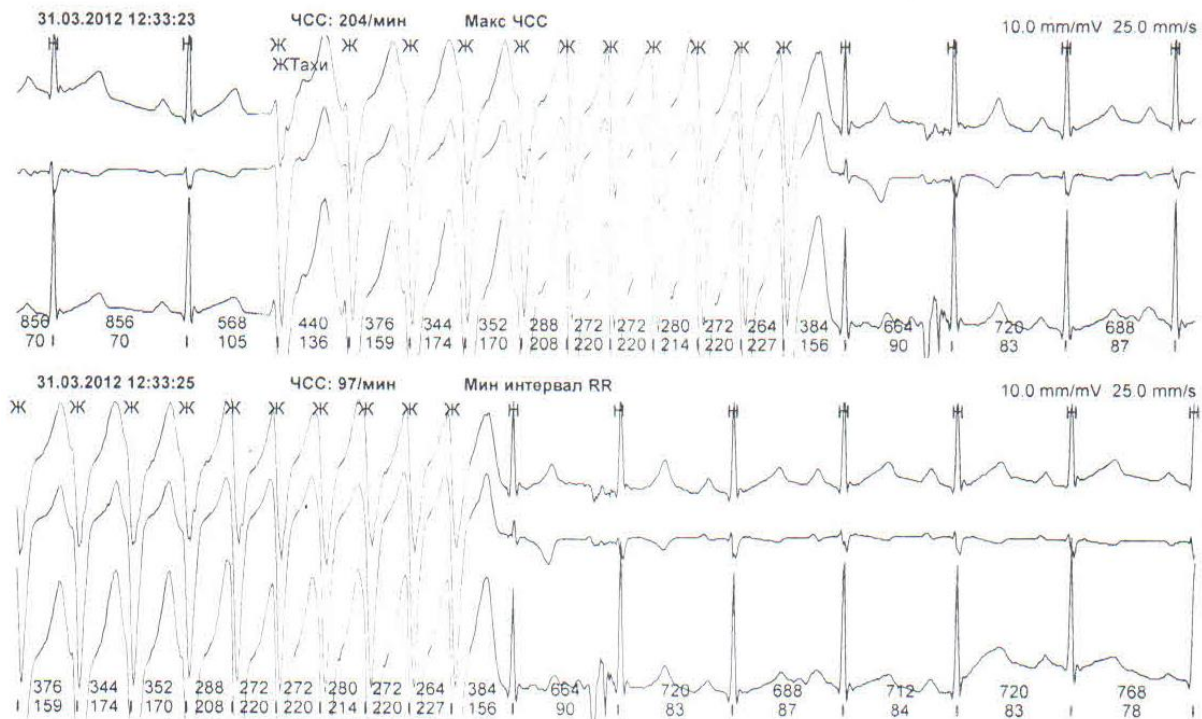
Также были выявлены три известных синонимичных полиморфизма rs3765097, rs2253273 и TMP ESP1 237 664 067 в исследуемой группе.

**Пациент 271.** Мы обнаружили миссенс мутацию в гене hRYR2 p.V1810L (c5428G> C) (рис. 2,а) у 42-летнего мужчины (кореец). Диагноз идиопатическая аритмия, характеризующаяся нестабильными пароксизмами желудочковой тахикардии, был выставлен в возрасте 41 года. В семейном анамнезе пациента не было случаев внезапной сердечной смерти или нарушений ритма сердца. При поступлении в ННҚЖ жалобы на монотонные боли и онемение левой руки, не связанные со стрессом. ЭХОКГ не выявил никаких

структурных патологий сердца. Тредмил тест показал высокую толерантность к физической нагрузке.

ЭКГ в покое. Ритм синусовый с частотой сердечных сокращений (ЧСС) 49 ударов в минуту, нормальное положение оси сердца, нормальный интервал PR (188 ms), QRS (74) ms , QT (446 ms), QTc (402 ms). Не наблюдалось изменений сегментов ST-T, T.

Характеристики ЖТ. В момент пароксизма ЖТ наблюдались предшествующий синусовый ритм с ЧСС 83 удара в минуту, бигемения, сопровождающаяся приступом ЖТ с ЧСС 220 ударов в минуту, широкие комплексы QRS, мономорфные, продолжительность пароксизма 3,2 сек (рисунок 3).

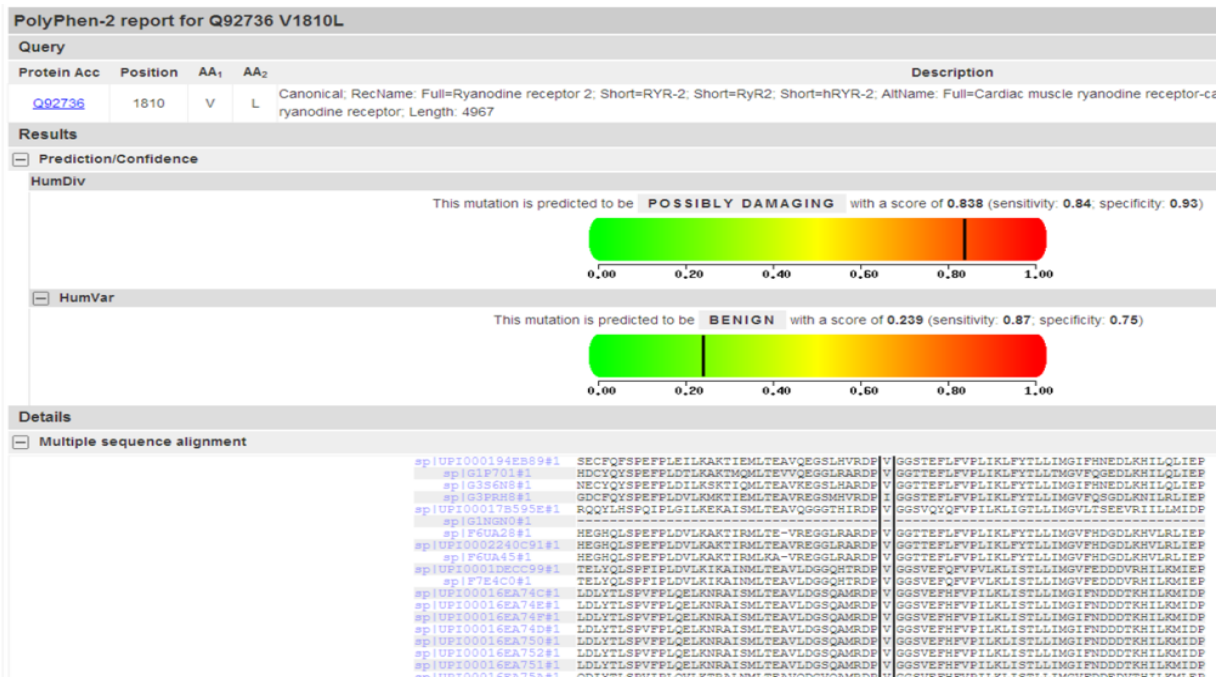


**Рисунок 3. Электрокардиограмма пациента №271.**

(Figure 3. Electrocardiogram of patient No. 271).

Предикция варианта hRYR2. Генетический вариант в гене hRYR2 с.G5428C, кодирующий замену аминокислоты валин на лейцин в кодоне 1810 в белке RYR2-V1810L, был обнаружен у пациента #271

(таблица 1). Три из пяти алгоритмов показали, что данный вариант патогенный (рисунок 4). Данный вариант не был обнаружен в базах данных ESP6500 и 1000Genomes Project.

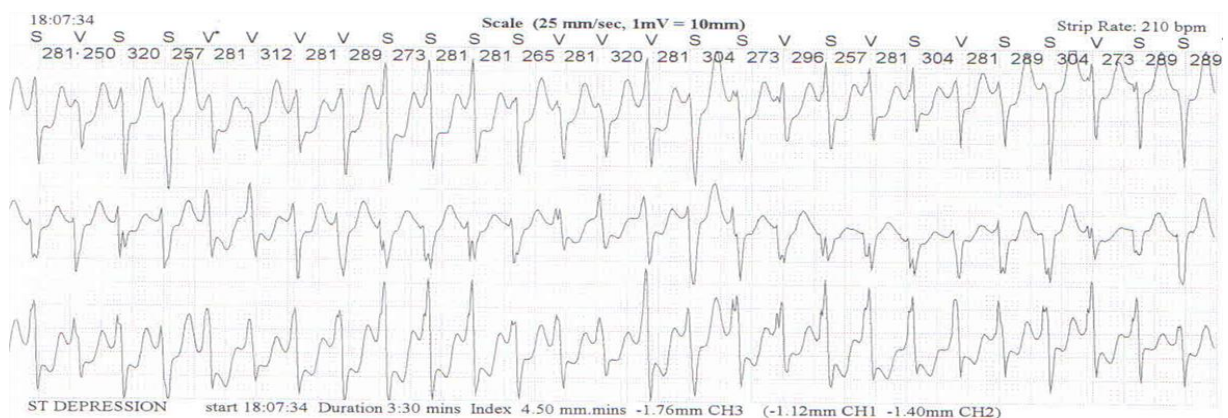


**Рисунок 4. Оценка функционального эффекта, анализ патогенности мутации p.V1810L, выявленной в гене hRYR2 у больного № 271 с помощью PolyPhen-2. Коэффициент патогенности составляет 0.83, интерпретация – патогенная.**

(Figure 4. Assessment of the functional effect, analysis of the pathogenicity of the p.V1810L mutation detected in the hRYR2 gene in patient No. 271 using PolyPhen-2. Pathogenicity coefficient is 0.83, interpretation - pathogenic).

После выявления мутации p.V1810L (с5428G> C) у пациента №271, наличие данного миссенс варианта проверяли у матери пациента и у трех детей. В результате секвенирования мы не обнаружили мутацию p.V1810L (с5428G> C) у матери и у 2 детей пациента, однако выявили у одного сына 8 лет в гетерозиготном состоянии. На момент генетического скрининга у ребенка не было выявлено никаких клинических симптомов аритмии. Отец пациента не принимал участие в исследовании.

**Пациент № 239.** Миссенс вариант p.D4631V hRYR2 (с13892A> T, рис.2, b) был обнаружен у 23-летней женщины (казашка). Впервые симптомы заболевания были выявлены в 13 лет с рецидивами обморока и появлением характерной ЭКГ-картины преждевременных моно / полиморфных желудочковых сокращений, сопровождаемых двунаправленной желудочковой тахикардией и полиморфной желудочковой тахикардией (рисунок 5).



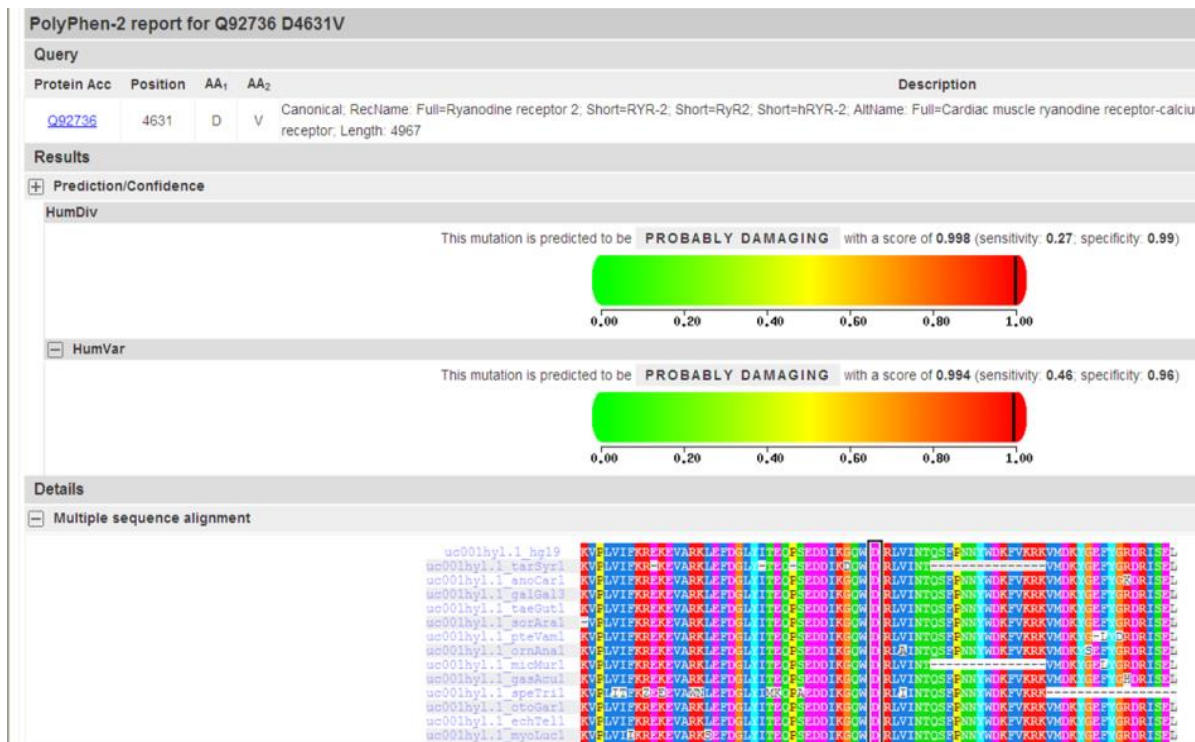
**Рисунок 5. Электрокардиограмма пациента №239.**  
(Figure 5. Electrocardiogram of patient # 239).

Была госпитализирована в ННҚ с жалобами на сердечные приступы, одышку при физических упражнениях, слабость и усталость. С детства у нее было учащенное сердцебиение, головокружение, судороги, обмороки, частые респираторные инфекции, хронический пиелонефрит и сколиоз. В возрасте 16 лет был диагностирован КПЖТ во время физических упражнений. Ей была произведена радиочастотная абляция правого желудочка и ква-трикуспидального перешейка для снижения риска ВСС. В том же году был имплантирован кардиовертер-дефибриллятор и назначены бета-блокаторы. В семейном анамнезе обмороков у членов семьи не наблюдалось внезапных обмороков, сердечной недостаточности и ВСС.

ЭКГ в покое. Синусовый ритм с ЧСС 60 ударов в минуту, нормальное положение оси сердца нормальный интервал PR (166ms), QRS (96) ms и QT (432 ms). Сегменты ST-T и T без изменений. В покое иногда наблюдались преждевременные желудочковые комплексы и предсердная тахикардия.

Характеристики ЖТ. Во время начала пароксизма ЖТ, комплекс QRS узкий 90 ms, синусовый ритм с ЧСС 119 ударов в минуту, бигемения. Пароксизм полиморфной двунаправленной ЖТ с ЧСС 234 ударов в минуту. Морфология QRS характерна для двунаправленной ЖТ, сменяющейся каждые 5-6 сокращений с признаками блокады правой и левой ножек пучка Гиса (рисунок 5). Пароксизм ЖТ провоцируется физической нагрузкой. Нагрузочные пробы и адреналиновая проба не проводились.

Предикция варианта hRYR2. Генетический вариант D4631V был оценен как патогенный пятью из пяти алгоритмов предикции (таблица 1, рисунок 6). Данный вариант не обнаружен в базах данных ESP6500 и 1000 Genomes и среди лиц контрольной группы. Секвенирование гена hRYR2 было проведено обоим родителям данной пациентки. Миссенс вариант p.D4631V hRYR2 (c13892A> T) не был обнаружен у обоих родителей, что свидетельствует, что это *de-novo* мутация, вызвавшая заболевание у пациентки.



**Рисунок 6. Оценка функционального эффекта, анализ патогенности мутации D4631V, выявленной в гене RYR2 у больной № 239 с помощью PolyPhen-2.**

**Кoeffициент патогенности составляет 1, интерпретация – патогенная.**

(Figure 6. Evaluation of the functional effect, analysis of the pathogenicity of the D4631V mutation detected in the RYR2 gene in patient No. 239 using PolyPhen-2. Pathogenicity coefficient is 1, interpretation is pathogenic)

**Пациент № 444.**

Вариант p.T2504M (c7511C> T) в гене hRYR2 был обнаружен у 20-летней женщины (казашка). Клинический диагноз: сердечная аритмия, нестабильная желудочковая тахикардия. Приступы ЖТ начались в 19 лет. Она находилась под амбулаторным наблюдением врача кардиолога. Поступила в ННҚ с жалобами на одышку при небольшой физической активности, общей слабости, периодических болях и с ощущениями

перебоев в работе сердца. ЭХОКГ не показала никаких структурных нарушений в сердце. Пациентка лечилась антиаритмическими препаратами без особого эффекта. Пациентке была проведена радиочастотная абляция аритмогенного фокуса в правом желудочке дважды, показавшая успех только со второй попытки. 24-часовое мониторирование ЭКГ не выявило аритмии. В семейном анамнезе не встречались аритмии.



ЭКГ в покое. Синусовый ритм с ЧСС 76 ударов в минуту, вертикальная ось сердца, Интервалы PR (140) ms, QRS (86) ms, QT (382 ms), QTc (398 ms). Сегмент ST-T без патологии.

Характеристики ЖТ. 24 часовой мониторинг ЭКГ выявило 6642 эпизодов желудочковых комплексов с блокадой левой ножки пучка Гиса, преждевременные желудочковые сокращения 600, бигемения 332, пароксизмы ЖТ с ЧСС 192 ударов в минуту (рисунок 7).



**Рисунок 7. Электрокардиограмма пациента №444.**

(Figure 7. Electrocardiogram of the patient No. 444)

Предикция варианта *hRYR2*. Выявленный генетический вариант *hRYR2* T2504M (с.C7511T, рис. 1с) был ассоциирован с развитием АДПЖ/ARVD2 (HGMD CM010424) в раннем исследовании [6]. АДПЖ/ARVD2 фенотип напоминает и перекрывается с фенотипами КПЖТ, так как структурные аномалии (потеря миоцитов преимущественно правого желудочка с заменой жировой или фиброзно-жировой тканью) часто отсутствуют или остаются незамеченными при использовании неинвазивных методов визуализации. Предсказание *in-silico* указывает на патогенность данной мутации, приводящей к развитию заболевания (таблица 1).

#### Обсуждение

Мутации гена *hRYR2* вызывают спектр вариабельных и сходных клинических фенотипов, таких как пациенты с воспроизводимой двунаправленной, полиморфной ЖТ при тестировании с физической нагрузкой; пациенты, имеющие только полиморфную ЖТ; и пациенты с идиопатической ЖТ. Более того, появление CPVT1 и ARVD2 в пределах одной семьи породило предположение, что эти два объекта могут соответствовать разной степени фенотипической экспрессии одного и того же заболевания [18]. Учитывая различные фенотипы и переменную пенетрантность многочисленных мутаций *hRYR2*, мы решили исследовать 35 пациентов, 33 из которых с диагнозом идиопатической ЖТ, а двое пациентов с КПЖТ/CPVT1, проведя скрининг мутаций в гене *hRYR2* методом прямого секвенирования.

Мы обнаружили гетерозиготную миссенс-мутацию с.A13892T (D4631V *hRYR2*; пациент # 239) с высоким патогенным потенциалом (высокие показатели прогноза

*in-silico*, *de-novo*, справочные базы данных отрицательны) у пациента с классическими клиническими характеристиками КПЖТ/CPVT. Пенетрантность этого варианта *de-novo* следует считать высокой из-за раннего возраста начала заболевания и выраженного и тяжелого клинического течения. Из-за сохраняющихся симптомов и риска развития BCC пациентке № 239 выполнена селективная симпатэктомия.

Генетический вариант T2504M, ранее ассоциированный с развитием АДПЖ/ARVD2 [14] наблюдался у 20-летнего пациента с идиопатической желудочковой тахикардией. Пациент № 444 прошел успешную радиочастотную абляцию, и в назначении антиаритмических препаратов не было необходимости. Однако на основании идентификации мутации гена *hRYR2*, связанной с ARVD2, стратегия ведения пациентов была изменена. Для выявления признаков возможной аритмогенной дисплазии пациенту было рекомендовано проведение МРТ сердца.

Патогенное воздействие третьего генетического варианта (V1810L; пациент № 271) на функцию канала *RYR2* остается неясным. Позднее начало заболевания и отсутствие других клинических характеристик КПЖТ/CPVT свидетельствуют о механистической связи с фенотипом. Однако, учитывая серьезность ошибочного диагноза CPVT, нам, возможно, придется рассмотреть такие редкие генетические варианты, как варианты с низкой пенетрантностью или восприимчивостью, предрасполагающие носителей к CPVT-подобным симптомам при определенных условиях, если не доказан нейтральный эффект; или в функциональных исследованиях не будет доказано

клиническое значение варианта. Вариант, обнаруженный у пациента № 271, был обнаружен также у бессимптомного родственника, 8-летнего сына пациента. Клиническая оценка ребенка не показала каких-либо структурных патологий сердца. ЭКГ была без нарушений. На основании генетического тестирования мальчику было рекомендовано регулярно проходить обследование у кардиолога и находиться под наблюдением.

На сегодняшний день не предложено основанной на генотипе стратификации риска или дифференцированного подхода к лечению на основе CPVT-позитивных вариантов. Однако раннее генетическое тестирование рекомендовано Обществом сердечного ритма и Европейской ассоциацией сердечного ритма для клинического управления и принятия терапевтических решений с участием членов семьи, поскольку КПЖТ/CPVT может представлять собой синдром внезапной смерти или синдром внезапной детской смерти в качестве первого проявления [5, 7 27]. Жизненно важной задачей является выяснить, моделируется ли влияние вариантов с низкой пенетрантностью генетическим фоном или негенетическими факторами (образ жизни, факторы окружающей среды и т.д.) и каким образом. Особенно тщательное клиническое наблюдение носителей варианта с низкой пенетрантностью будет существенно способствовать пониманию дальнейших факторов риска и оценке их влияния на начало и прогрессирование заболевания.

Таким образом, скрининг мутаций в гене сердечного рецептора риаодина типа 2 *hRyR2* у пациентов с ЖТ позволило выявить клинически значимые мутации, что позволило скорректировать тактику лечения данных пациентов, и предложить скрининг данных вариантов у ближайших родственников. Данное исследование будет полезно для казахстанских пациентов с желудочковыми нарушениями ритма в оценке необходимости генетического скрининга и надежной генетической консультации для прогнозирования и профилактики внезапной сердечной смерти и дифференциальной диагностики аритмии.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли равный вклад в подготовку и написание статьи.

**Финансирование:** Данное исследование проводилось в рамках проекта МОН РК по грантовому финансированию АР05134683.

**Конфликт интересов:** отсутствует.

**Сведения о публикации:** ни один фрагмент данной статьи не был опубликован в других журналах и не находится на рассмотрении другими издательствами.

#### Литература:

1. Konysbaeva K.K., Khabieva T.Kh., Uteuliev E.S., Myrzagulova A.O., Tekebaeva L.A., Baygunov M.A., Atarbaeva V.Sh., Saktapov A.K., Isk N.N. Rasprostranennost' bolezney sistemy krovoobrashcheniya po gorodu Almaty [The prevalence of diseases of the circulatory system in the city of Almaty] // *Meditsina [Medicine]*. (Almaty). 2017. No. 12 (186). pp. 15-19 [in Russian]

2. Aronow W.S., Ahn C., Mercado A.D., Epstein S.,

Kronzon I. Prevalence and association of ventricular tachycardia and complex ventricular arrhythmias with new coronary events in older men and women with and without cardiovascular disease // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2002. Vol. 57. P. 78–80.

3. Adzhubei I., Jordan D., and Sunyaev Sh. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2 // *Curr Protoc Hum Genet.* 2013 January ; 0 7: Unit7.20. doi:10.1002/0471142905.hg0720s76.

4. Adzhubei I., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A., Sunyaev Sh. A method and server for predicting damaging missense mutations // *Nat Methods.* 2010 Apr; 7(4): 248–249. doi: 10.1038/nmeth0410-248

5. Bhuiyan Z.A., Hamdan M.A., Shamsi E.T., Postma A.V., Mannens M.M., Wilde A.A., Al-Gazali L. A novel early onset lethal form of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia maps to chromosome 7p14-p22 // *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007. Vol. 18(10). P. 1060-6

6. Huang L., Liu C, Tang S, Su T, Cheng J. Postmortem genetic screening of SNPs in RyR2 gene in sudden unexplained nocturnal death syndrome in the southern Chinese Han population // *Forensic science international.* - 2014. Vol. 235. P. 14-8.

7. Jones P.P., Jiang D., Bolstad J., Hunt D.J., Zhang L., Demarex N., Chen S.R. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> measurements reveal that the cardiac ryanodine receptor mutations linked to cardiac arrhythmia and sudden death alter the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release // *Biochem.* 2008. Vol. 412. P. 171–8

8. Keating M.T., Keating M.T., Sanguinetti M.C. Molecular and cellular mechanisms of cardiac arrhythmias // *Cell.* 2001. Vol. 104. P. 569–580.

9. Laitinen P.J., Brown K.M., Piippo K. et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia // *Circulation.* 2001. Vol. 103. P. 485–490

10. Marks A.R. Ryanodine receptors/calcium release channels in heart failure and sudden cardiac death // *Journal of molecular and cellular cardiology.* 2001. Vol. 33(4). P. 615-24.

11. Martin C.A., Martin C.A., Huang C.L., Matthews G.D. Recent developments in the management of patients at risk for sudden cardiac death // *Postgraduate Medicine.* 2011. No. 123(2). P. 84–94.

12. Medeiros-Domingo A., Bhuiyan Z.A., Tester D.J., Hofman N., Bicker H., van Tintelen J.P., Mannens M. M., Wilde A.A., Ackerman M.J. The RYR2-encoded ryanodine receptor/calcium release channel in patients diagnosed previously with either catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia or genotype negative, exercise-induced long QT syndrome: a comprehensive open reading frame mutational analysis // *Journal of the American College of Cardiology.* 2009. Vol. 54(22). P. 2065-74.

13. More D., O'Brien K., Shaw J. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia in the elderly // *Pacing Clin. Electrophysiol.* 2002. Vol. 25. P. 1266–1269.

14. Ohno S., Hasegawa K., Horie M. Gender Differences in the Inheritance Mode of RYR2 Mutations in Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Patients // *PLoS ONE.* 2015. Vol. 10(6): p. e0131517.

15. Priori S.G. Evidence that human cardiac myocytes

divide after myocardial infarct // Italian heart journal. Supplement : official journal of the Italian Federation of Cardiology. 2001. Vol. 2(11). P. 1248-9.

16. *Priori S.G., Chen S.R.* Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis // *Circulation research*. 2011. Vol. 108(7). - P. 871-83.

17. *Priori S.G., Napolitano C., Memmi M., Colombi B., Drago F., et al.* Clinical and molecular characterization of patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia // *Circulation*. 2002. Vol. 106. P. 69–74

18. *Puranik R., Chow C.K., Dufloy J.A., Kilborn M.J., McGuire M.A.* Sudden death in the young // *Heart Rhythm*. 2005. Vol. 2. P. 1277–1282.

19. *Schwarz J.M., Cooper D.N., Schuelke M., et al.* Mutationtaster 2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014; 11(4): 361–2.

20. *Schwarz J.M., Rödelberger C., Schuelke M., et al.* Mutation Taster evaluates disease causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010; 7(8): 575–6.

21. *Sherry S.T., Ward M.H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E.M., Sirotkin K.* dbSNP: the NCBI database of genetic variation // *Nucleic Acids Res*. 2001 Jan 1; 29(1): 308–311. doi: 10.1093/nar/29.1.308

22. *Stenson P., Mort M., Ball E., Evans K., Hayden M., Heywood S., Hussain M., Phillips A., Cooper D.* The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies //

*Hum Genet*. 2017; 136(6): 665–677. doi: 10.1007/s00439-017-1779-6

23. *Sumitomo N., Harada K., Nagashima M., Yasuda T., Nakamura Y., Aragaki Y., Saito A., Kurosaki K., Jouo K., Koujiro M., Konishi S., Matsuoka S., Oono T., Hayakawa S., Miura M., Ushinohama H., Shibata T., Niimura I.* Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: electrocardiographic characteristics and optimal therapeutic strategies to prevent sudden death // *Heart*. 2003. Vol. 89(1). P. 66-70.

24. *Sumitomo N.* Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia // *Journal of arrhythmia*. 2016. Vol. 32(5). P. 344-351.

25. *Thiene G., Corrado D., Basso C.* Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia // *Orphanet J. Rare Dis*. 2007. No. 2. P. 45

26. *Tester D.J., Spoon D.B., Valdivia H.H., Makielski J.C., Ackerman M.J. et al.* Targeted mutational analysis of the RyR2-encoded cardiac ryanodine receptor in sudden unexplained death: a molecular autopsy of 49 medical examiner/coroner's cases // *Mayo Clinic proceedings*. - 2004. Vol. 79(11). P. 1380-4.

27. *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., Danielli G.A., Rampazzo A.* Identification of mutations in the cardiac ryanodine receptor gene in families affected with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 2 (ARVD2) // *Hum Mol Genet*. 2001. Vol. 10. P. 189–194

#### Контактная информация:

**Акильжанова Айнура Рахметуловна** – д.м.н., PhD, ассоциированный профессор, ведущий научный сотрудник, руководитель Лаборатории Геномной и персонализированной медицины, Центр наук о жизни, National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, Астана, Казахстан.

**Почтовый адрес:** Пр. Кабанбай батыра, 53, Астана, 010000, Казахстан

**E-mail:** akilzhanova@nu.edu.kz

**Телефон:** 87172706501