Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce

Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie se zaměřením na genetické vyšetření

Pavol Tomašov

Praha (2016)

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

Školicí pracoviště: Kardiologická klinika, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole

Autor: MUDr. Pavol Tomašov

Školitel: Prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: ……..v ……..hod.
kde: ……

S dizertační prací je možno se seznámit na děkanátu
2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

Souhrn……...……..…….5
1. Úvod……...…….…...…....….…7
1.1. Definice hypertrofické kardiomyopatie……..…….…...….7
1.2. Historie a epidemiologie…….……...……...…….8
1.3. Etiologie……..……8
1.4. Patofyziologie……...…….8
1.5. Fenotyp……...……8
1.6. Klinické důsledky……...……9
1.7. Diagnostika…….....9
1.8. Léčba……10
2. Cíle práce……..……11
3. Metody……....12
3.1. Populace……....12
3.2. Kardiologické vyšetření……12
3.3. Echokardiografické vyšetření…….....12
3.4. Výběr kandidátního genu……12
3.5. Odběr vzorků pro genetické vyšetření a izolace DNA……13
3.6. Amplifikace DNA……13
3.7. Sekvenování……..13
3.8. Genetická analýza……13
3.9. Statistická analýza……14
4. Výsledky……15
4.1. Genetické varianty v genu NEBL……15
4.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM……16
4.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM……..17
5. Diskuze……...18
5.1. Genetické varianty v genu NEBL……18
5.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM……19

5.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM…….20
6. Závěr……...22
Literatura……...23
Seznam publikací……26

Souhrn

Úvod: Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je nejčastější monogenně dědičné onemocnění srdce s velkou genetickou i klinickou variabilitou. Genetické vyšetření pacientů s HCM je důležité k určení etiopatogeneze onemocnění a stává se součástí péče o pacienty a jejich příbuzné.

Cíl: Cíle naší práce zahrnovaly následující použití genetického vyšetření pacientů s HCM v základním i klinickém výzkumu:

1. Identifikovat genetické varianty u pacientů s HCM v novém kandidátním genu *NEBL* pro protein Z-disků sarkomer nebulette.
2. Určit klinické a echokardiografické prediktory nálezu mutací v nejčastějších sarkomerických genech asociovaných s HCM u české populace.
3. Nalézt echokardiografické parametry schopné určit genotyp příbuzných pacientů s HCM před rozvojem fenotypu.

Výsledky: V souboru 95 pacientů s HCM jsme u jednoho nemocného nalezli novou genetickou variantu v konzervovaném místě genu *NEBL* (p.H171R), která se nenacházela v kontrolní populaci a měla odhadovaný poškozující dopad na strukturu proteinu. V souboru 48 pacientů s HCM vyšetřených na přítomnost mutací v nejčastějších sarkomerických genech jsme nalezli významnou asociaci mezi nižším věkem v době diagnózy a reverzním typem mezikomorového septa a nálezem mutace. V souboru 20 geneticky vyšetřených příbuzných pacientů s HCM jsme potvrdili roli kombinovaného echokardiografického ukazatele k detekci jedinců s pozitivním genotypem.

Závěr: Genetické vyšetření je užitečným nástrojem v diagnostice HCM. Umožnilo nám nalézt mutaci v novém kandidátním genu pro HCM, identifikovat faktory asociované s nálezem mutací v sarkomerických genech a faktory použitelné k určení genotypu příbuzných.

Abstract

Introduction: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common monogenic cardiac disease with vast genetic and clinical heterogeneity. Genetic testing of HCM patients is important in determining the etiopathogenesis of the disease and is becoming an integral part of patient care.

Aim: The aims of our work included the following implementation of genetic testing in HCM in both basic and clinical research:

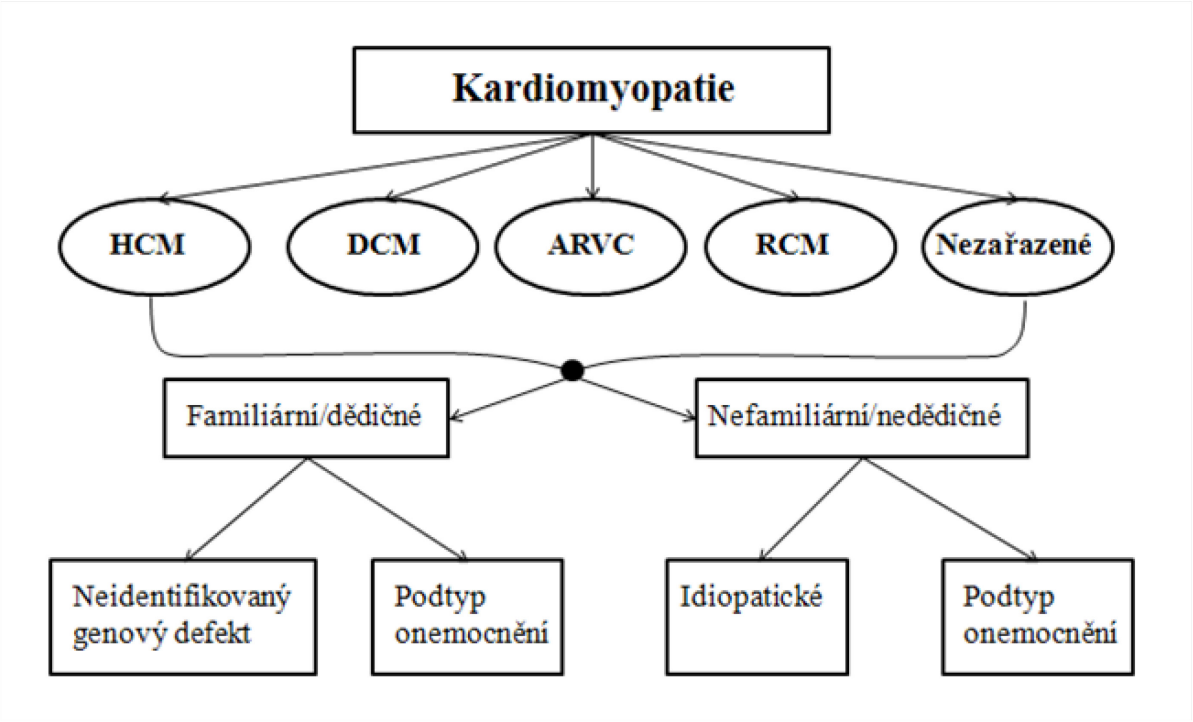
1. To identify genetic variants in a novel candidate gene *NEBL* coding Z-disc protein nebulette in HCM patients.
2. To determine clinical and echocardiographic variables associated with the presence of mutations in the most common sarcomeric genes in the Czech population.
3. To find echocardiographic parameters useful in determining the genotype of relatives before the development of phenotype.

Results: In a cohort of 95 patients with HCM we identified a novel genetic variant in a conserved spot of *NEBL* gene (p.H171R) in one patient. The variant was not found in a control population and was predicted to have a damaging effect on the protein's structure. In a cohort of 48 HCM patients tested for mutations in the most common sarcomeric genes, we found a significant association between a younger age at diagnosis and reverse morphology of interventricular septum and the presence of mutation. In a group of 20 genetically tested relatives, we confirmed the role of a combined echocardiographic index to identify genotype positive individuals.

Conclusion: Genetic testing is a useful tool in diagnostics of HCM. It allowed us to identify a mutation in a novel candidate gene for HCM, define factors associated with the presence of mutations in sarcomeric genes and factors capable of determining the genotype status of relatives.

1. Úvod

Kardiomyopatie jsou heterogenní skupinou onemocnění, u kterých dochází ke strukturálnímu anebo funkčnímu poškození srdečního svalu různé etiologie (Maron BJ. et al., 2006, Elliott P. et al., 2008). Podle klasifikace Evropské kardiologické společnosti (ESC) rozeznáváme hypertrofickou (HCM), dilatační (DCM), arytmogenní (ARVC), restriktivní (RCM) a ve skupině nezařazených také nonkompaktní (LVNC) a Tako-tsubo kardiomyopatii (Obr. 1.1., Elliott P. et al., 2008). Některé z kardiomyopatií jsou monogenně dědičná onemocnění. Genetické vyšetření pacientů s kardiomyopatiemi vedlo k identifikaci mutací zodpovědných za vývoj jednotlivých onemocnění, částečně ukázalo spojitost mezi typem mutací a některými parametry fenotypu či klinických důsledků onemocnění a uplatnilo se ve vyšetřování příbuzných pacientů s genetickými formami chorob myokardu.



Obr. 1.1.

Klasifikace kardiomyopatií podle ESC. HCM - hypertrofická kardiomyopatie, DCM - dilatační kardiomyopatie, ARVC - arytmogenní kardiomyopatie, RCM - restriktivní kardiomyopatie (Elliott P. et al., 2008).

1.1. Definice hypertrofické kardiomyopatie

HCM je nemoc, u které dochází ke zvětšení tloušťky levé komory srdeční při nepřítomnosti abnormálních hemodynamických podmínek (jako v případě arteriální hypertenze, vrozených a chlopenních vad), které jsou schopné zapříčinit danou míru hypertrofie (Elliott P. et al., 2014).

1.2. Historie a epidemiologie

HCM byla poprvé popsána britským patologem Tearem v roce 1958 na sérii pitevních kazuistik 8 mladých lidí s hypertrofií levé komory (Teare D., 1958). HCM byla dlouho považována za vzácnou nemoc, ale zlepšení diagnostických možností, dané zejména rozvojem echokardiografie, ukázalo, že jde o nejčastější monogenně dědičné onemocnění srdce s prevalencí 1:500 v obecné populaci (Maron BJ. et al., 1995).

1.3. Etiologie

HCM může vzniknout i v důsledku některých získaných onemocnění, primárně jde ale o dědičnou kardiomyopatii, která je ve většině případů způsobena mutacemi v genech pro sarkomerické proteiny s autozomálně dominantním přenosem (Gersh BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). V současnosti je se vznikem HCM asociováno více než 2000 mutací v alespoň 20 různých genech (Yingchoncharoen T., Tang WW., 2014). Většina pacientů (přes 80 %) s pozitivním genetickým vyšetřením má mutaci v jednom ze dvou genů (gen *MYH7* pro těžký řetězec β myozinu a gen *MYBPC3* pro myozin vazebný protein C), zastoupení ostatních genů je výrazně nižší (Maron BJ, Maron MS., 2013). Až polovina pacientů z některých souborů vyšetřených pro přítomnost mutací v sarkomerických genech má přitom negativní výsledek genetického vyšetření, předpokládá se postižení dalších genů, dosud neasociovaných s HCM (Mouton J. et al., 2015). Kromě postižení genů pro proteiny sarkomery dochází ke vzniku fenotypu HCM i u dalších genetických poruch, jako jsou vrozené poruchy metabolizmu, malformační syndromy, mitochondriální kardiomyopatie, neuromuskulární a infiltrativní onemocnění (Elliott P. et al., 2014).

1.4. Patofyziologie

Patofyziologické mechanizmy vedoucí od genetické poruchy k hypertrofii a změněné organizaci sarkomer a rozvoji fibrózy myokardu, nejsou detailně objasněny. Předpokládá se neefektivní energetické využití ATP s následnou hypertrofií jako kompenzačním mechanizmem, změněná citlivost na ionty kalcia při regulaci kontrakce a relaxace i zvýšená apoptóza kardiomyocytů s následnou fibrózou (Crilley JG. et al., 2003, Gupte TM. et al., 2015). Penetrance mutací je u HCM (jako i jiných kardiomyopatií) závislá na věku, rozvoj hypertrofie levé komory stoupá do 60 let. Účinek mutace na vznik fenotypu je ale přitom dán pravděpodobně již velmi časně. Na modelu transgenních myší s mutací způsobující HCM v genu pro těžký řetězec β myozinu vedlo farmakologické potlačení exprese tohoto genu k prevenci vzniku fenotypu jenom v případě, že bylo provedeno v časném postnatálním období (Cannon L. et al., 2015).

1.5. Fenotyp

HCM vede k vývoji základního znaku tohoto onemocnění, tedy k hypertrofii levé komory srdeční nevysvětlitelné hemodynamickými podmínkami. Míra i lokalizace hypertrofie jsou velmi variabilní a hypertrofie může být vyjádřena ve kterémkoliv segmentu levé komory (Maron MS. et al., 2009, Rangel I. et al., 2014, Cai C. et al., 2014). Do obrazu onemocnění rovněž patří hypertrofie a morfologické abnormality papilárních svalů levé komory, hypertrofie pravé komory a prodloužení obou cípů mitrální chlopně (Maron MS. et al., 2011). Hypertrofická levá komora pacientů s HCM má většinou dobrou systolickou funkci, přítomna je ale diastolická dysfunkce různého stupně, která vede k projevům srdečního selhání. Jedním z důsledků diastolické dysfunkce levé komory je i zvětšení levé síně. Krevní zásobení

myokardu je u pacientů s HCM zhoršené hypertrofií myokardu, zvýšeným diastolickým tlakem v levé komoře a mikrovaskulárním postižením koronárního řečiště. Důležitým hemodynamickým důsledkem HCM je přítomnost nitrokomorové obstrukce. U části pacientů dochází v dutině levé komory během systoly ke vzniku tlakového gradientu mezi dvěma částmi levé komory. Obstrukce vzniká nejčastěji ve výtokovém traktu levé komory srdeční, méně často na úrovni středních segmentů levé komory, nebo v komoře pravé (Maron MS. et al., 2006).

1.6. Klinické důsledky

Klinický význam HCM je dán rizikem náhlé srdeční smrti, morbiditou a mortalitou srdečního selhání a tromboembolickými komplikacemi fibrilace síní.
HCM je významnou příčinou náhlé smrti u mladých dospělých, včetně vrcholových sportovců (Maron BJ, Maron MS, 2013). Srdeční selhání je nejčastějším klinickým syndromem i důležitou příčinou úmrtí u pacientů s HCM. Jeho etiologie je multifaktoriální, podílí se na něm zejména diastolická dysfunkce levé komory, u částí pacientů i její systolická dysfunkce, nitrokomorová obstrukce a mitrální insuficience (Elliott P. et al., 2014). Morbidita a mortalita v důsledku fibrilace síní je dána zejména vznikem embolizační cévní mozkové příhody. Samostatnou kapitolou je riziko náhlé srdeční smrti u HCM, které je asociováno s několika rizikovými faktory, kam patří rodinná anamnéza náhlé smrti, anamnéza nevysvětlené synkopy, maximální hypertrofie levé komory nad 30 mm, záchyt nesetrvalých komorových tachykardií na ambulantním monitorování EKG a abnormální hemodynamická reakce na zátěž (Gersh BJ. et al., 2011) a také věk pacienta, rozměr levé síně a hodnota maximálního gradientu nitrokomorové obstrukce (Elliott. P. et al., 2014).

1.7. Diagnostika

Diagnóza HCM je kromě klinického vyšetření včetně rodinné a osobní anamnézy a EKG, založena na zobrazení hypertrofie levé komory jakoukoliv zobrazovací metodou (Elliott P. et al., 2014). Nejčastěji je hypertrofie detekována echokardiografickým vyšetřením, které je kromě toho nezastupitelné v detekci nitrokomorové obstrukce a zobrazení přidružených vad mitrální chlopně. Magnetická rezonance srdce rovněž dokáže zobrazit hypertrofii levé komory a získat další informace analogicky k echokardiografii a to i u pacientů s omezenou echokardiografickou vyšetřitelností. Navíc dokáže zobrazit přítomnost fibrózy myokardu pomocí sycení gadoliniem.
Genetické vyšetření se stává integrální součástí péče o pacienty s HCM. Faktory omezující aktuální klinický přínos genetického vyšetření jsou genetická variabilita onemocnění, nález genetických variant nejasného významu a omezená korelace genotypu a fenotypu (Charron P. et al., 2010, Gersh BJ. et al., 2011). Část pacientů může být nositeli mutace v genech doposud neasociovaných s HCM i mimo oblast sarkomery. Metody Sekvenování nové generace (NGS) umožňují efektivní a rychlou analýzu velkého množství genů nebo celého genomu. Vyšetření více genů ale přináší identifikaci více vzácných genetických variant, které je potřeba co nejpřesněji klasifikovat (MacArthur DG. et al., 2014). Nalezení vztahů konkrétních mutací a fenotypových znaků nebo prognózy HCM je obtížné pro velké množství mutací, chybějící potvrzení již publikovaných asociací a očekávané ovlivnění fenotypu HCM i dalšími genetickými a epigenetickými faktory (Elliott P. et al., 2014). Hlavní klinický význam genetického vyšetření HCM je genetická diagnostika příbuzných (Charron P. et al., 2010).

1.8. Léčba

U HCM neexistuje kauzální léčba a preventivní farmakoterapie u nositelů genotypu před vývojem fenotypu nebo u asymptomatických pacientů s již rozvinutou hypertrofií levé komory srdeční nevede ke změně klinického průběhu ani významnému ovlivnění fenotypu (Ho CY. et al., 2015, Axelsson A. et al., 2015). Všechny klinické dopady nemoci ale lze terapeuticky ovlivnit. V prevenci náhlé srdeční smrti hrají hlavní roli implantabilní kardiovertery-defibrilátory (Gersh BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). Základem léčby srdečního selhání je farmakoterapie zahrnující zejména betablokátory a non-dihydropyridinové blokátory kalciových kanálů. U nemocných s významnou nitrokomorovou obstrukcí navzdory farmakoterapii se využívá chirurgická myektomie a katetrizační alkoholová septální ablace (Veselka J. et al., 2016). Malá část pacientů s HCM podstupuje transplantaci srdce. Riziko tromboembolických komplikací u fibrilace síní se snižuje užíváním antikoagulační léčby, arytmie samotná se někdy léčí antiarytmiky a katetrizační ablací (Guttmann OP. et al., 2014).

2. Cíle práce

Cíle naší práce zahrnovaly následující použití genetického vyšetření pacientů s HCM v základním i klinickém výzkumu:
1. Identifikovat genetické varianty v novém kandidátním genu *NEBL* pro protein Z-disků sarkomer nebulette u pacientů s HCM.
Značná část pacientů s fenotypem HCM je bez záchytu mutace ve známých sarkomerických genech (40 - 50 %). Tuto skupinu mohou tvořit nedědičné změny morfologie levé komory a taktéž nemocní s mutacemi přítomnými v genech doposud neasociovaných s HCM. Při vzájemné genetické provázanosti familiárních kardiomyopatií lze očekávat nalezení patogenní mutace způsobující HCM i v genech asociovaných s jinými typy kardiomyopatií. Očekávaná četnost mutací v potenciálních nových genech pro HCM bude nízká (kolem 1 %).
2. Určit klinické a echokardiografické prediktory nálezu mutací v nejčastějších sarkomerických genech asociovaných s HCM u české populace.
Pacienti s přítomnou mutací v sarkomerických genech se od nemocných bez identifikované mutace podle zahraničních prací liší v několika parametrech, včetně rodinné anamnézy HCM, nižšího věku, větší míry hypertrofie levé komory a častější reverzní morfologie interventrikulárního septa (Binder J. et al., 2006, Bos JM. et al., 2014). Předpokládáme větší podíl nemocných s identifikovanými mutacemi v nejčastějších sarkomerických genech při přítomnosti zmíněných klinických parametrů i v české populaci a plánujeme porovnat, který z těchto faktorů je nejsilnějším prediktorem přítomnosti patogenní mutace.
3. Nalézt echokardiografické parametry schopné určit genotyp příbuzných pacientů s HCM před rozvojem hypertrofie levé komory.
Při absenci nebo negativním výsledku genetickém vyšetření je péče o příbuzné pacientů s HCM založena na provedení klinického, EKG a echokardiografického vyšetření. U příbuzných bez jasných známek fenotypu onemocnění je nutné opakované vyšetření vzhledem k penetranci závislé od věku. Několik echokardiografických parametrů před rozvojem fenotypu bylo asociováno s nosičstvím patogenní mutace, výsledky jednotlivých prací jsou ale kontroverzní. V české populaci tyto parametry doposud nebyly testovány. Předpokládáme schopnost morfologických a funkčních echokardiografických parametrů rozlišit jedince s pozitivním a negativním genotypem v populaci geneticky vyšetřených příbuzných ještě před rozvojem hypertrofie levé komory.

3. Metody

3.1. Populace

Studovanou populaci tvořili konsekutivně vyšetření nepříbuzní pacienti českého původu se stanovením diagnózy HCM ve dvou pražských terciárních kardiologických centrech (Fakultní nemocnice Motol a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady) dle doporučených postupů ESC (Elliott P. et al., 2014). Pro analýzu kandidátního genu *NEBL* pro protein nebulette bylo vyšetřených 95 konsekutivních pacientů. Pro určení morfologických a klinických parametrů u pacientů s identifikovanou mutací v nejčastějších sarkomerických genech bylo vyšetřeno 48 konsekutivních pacientů. Pro práci s identifikací parametrů určujících pozitivní genotyp u příbuzných bylo vyšetřeno 99 konsekutivních pacientů. U nemocných s identifikovanou mutací v nejčastějších sarkomerických genech byli osloveni všichni příbuzní 1. stupně s nabídkou genetického vyšetření na přítomnost dané mutace a komplexního kardiologického vyšetření. Geneticky bylo vyšetřeno 52 příbuzných, klinicky poté 20 z těchto příbuzných. Kontrolní skupinu pro porovnání výskytu genetických variant identifikovaných v genu *NEBL* tvořilo 320 jedinců bez fenotypu jakékoliv kardiomyopatie vyšetřených pomocí echokardiografie v berlínském terciárním kardiologickém centru (Univerzitní nemocnice Charité) a 192 klinicky zdravých dárců krve ze stejného pracoviště.
Protokoly všech studií splňovaly podmínky Helsinské deklarace a byly schváleny etickými komisemi jednotlivých institucí.

3.2. Kardiologické vyšetření

Kardiologické vyšetření pacientů s HCM a jejich příbuzných zahrnovalo odebrání anamnézy včetně rodinné anamnézy. Pacientům a příbuzným bylo dále provedeno fyzikální vyšetření, 12-ti svodové EKG a echokardiografické vyšetření. Při nedostatečné echokardiografické vyšetřitelnosti byla provedena rovněž magnetická rezonance srdce.

3.3. Echokardiografické vyšetření

Echokardiografické vyšetření bylo provedeno zkušenými echokardiografisty na přístroji Philips Sonos 5500 (Philips Healthcare, Best, Nizozemsko) ve standardních projekcích s použitím dvourozměrného (2D) zobrazení, M-mode, pulzního a kontinuálního dopplerovského vyšetření a tkáňového dopplerovského zobrazení podle doporučení Americké společnosti pro echokardiografii (American Society of Echocardiography, Lang RM. et al., 2005).

3.4. Výběr kandidátního genu

Při hledání vhodného kandidátního genu doposud neasociovaného se vznikem HCM jsme studovali dostupnou literaturu stran informací o proteinech s důležitou funkcí v oblasti sarkomery nebo v její blízkosti a sledovali jsme případnou roli těchto proteinů ve vzniku jiných forem familiárních kardiomyopatií.
Protein nebulette je 109 kDa velký, vláknitý protein, poprvé popsán v roce 1995 na základě zkřížené imunitní reakce s protilátkami proti nebulinu (Moncman CL., Wang K. 1995). Gen *NEBL* pro protein nebulette je lokalizovaný na chromozomu 10p12, skládá se z 28 exonů a kóduje protein o délce 1014 aminokyselin. Struktura proteinu se skládá ze čtyř domén: 1) N-terminální konec proteinu je bohatý na kyselinu glutamovou, 2) centrální repetitivní doména

je tvořena 23 nebulinu podobnými moduly ("nebulin-like repeats"), 3) spojovací doména bohatá na serin, kde může docházet k fosforylaci proteinu a 4) C-terminální SH3 (Src-homology 3) doména (Moncman CL., Wang K., 2000). Nebulette je nepostradatelný protein pro správnou organizaci myofibril a stabilitu sarkomery. Díky vysoce konzervované C-terminální SH3 doméně se očekává i možná role nebulette v intracelulárním přenosu signálu (Moncman CL., Wang K., 1995, Ram R., Blaxall BC., 2010). Genetické varianty v genu *NEBL* byly asociovány s DCM. U pacientů s familiární formou DCM byly nalezeny mutace, které byly dále zkoumány na zvířecím modelu. Jejich zvýšena exprese na myších vedla k výraznému fenotypu DCM, včetně časně fatálních forem (Purevjav E. et al., 2010). Mutace v genu pro homologní protein kosterního svlastva - nebulin patří mezi hlavní příčiny geneticky i klinicky heterogenního onemocnění kosterního svalstva - nemalinové myopatie (Pelin K. et al., 1997). Informace dostupné o proteinu nebulette a genu *NEBL* vedly k výběru tohoto genu jako kandidátního genu k hledání doposud neobjevených mutací způsobujících HCM.

3.5. Odběr vzorků pro genetické vyšetření a izolace DNA

Pro účely genetického vyšetření byla pacientům s HCM odebrána krev z periferní žíly. U příbuzných pacientů s identifikovanou mutací byly k odběru vzorků použity odběrové tampony FLOQ Swabs (Copan Flock Technologies, Brescia, Itálie) k získání buněk bukální sliznice. Izolace DNA ze zaslaných vzorků probíhala použitím standardních komerčních kitů QIAQuick DNA mini kits (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) a JetQuick DNA Isolation kits (GENOMED GmbH, Loehne, Německo).

3.6. Amplifikace DNA

K amplifikaci DNA byla před jejím sekvenováním použita polymerázová řetězová reakce (PCR). Pomocí PCR byla amplifikována DNA všech exonů a přilehlých úseků intronů genu *NEBL* pro identifikaci nových mutací u pacientů s HCM a genů *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3* (srdeční troponin I) a *TNNT2* (srdeční troponi T) pro analýzu morfologických a klinických parametrů pacientů s mutacemi v nejčastějších sarkomerických genech a rovněž pro následné vyšetření příbuzných. Výsledný produkt každé PCR byl ověřen gelovou chromatografií v 3% agarózovém gelu porovnáním s hmotnostním markerem a nepřítomnost kontaminace byla prokázána negativní kontrolou v každé PCR reakci.

3.7. Sekvenování

Pro sekvenování amplifikovaných úseků DNA byla provedena Sangerova sekvenace (Sanger F., Coulson AR., 1975). K enzymatickému vyčištění PCR produktů před sekvenací byla použita rekombinantní alkalická fosfatáza (Shrimp alkaline phospatase) a exonukleáza Exo I. K vyčištěnému produktu se poté přidal zvolený primer a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit. Produkt sekvenačního cyklu byl vyčištěn gelovou filtrací k odstranění nízkomolekulárních látek použitím Millipore MultiScreen Assay System se Sephadex G-50 Superfine. (GE Healthcare life sciences). Pro analýzu výsledného produktu byl použitý automatický sekvenátor ABI Prism 3100 Avant (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

3.8. Genetická analýza

Data ze sekvenace byla zpracována pomocí Sequencher software version 4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA). Všechny detekované genetické varianty byly ověřeny alespoň dvěma nezávislými PCR a sekvenačními cykly. Výskyt identifikovaných genetických variant byl

sledován v populačních databázích dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) a Exome Variant Server poskytnutý Exome Sequencing Project z National Heart, Lung and Blood Institute (http://evs.gs.washington.edu/EVS/). U identifikovaných variant jsme provedli predikci dopadu mutace pomocí nástrojů PolyPhen2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) a Mutation Taster (http://www.mutationtaster.org).

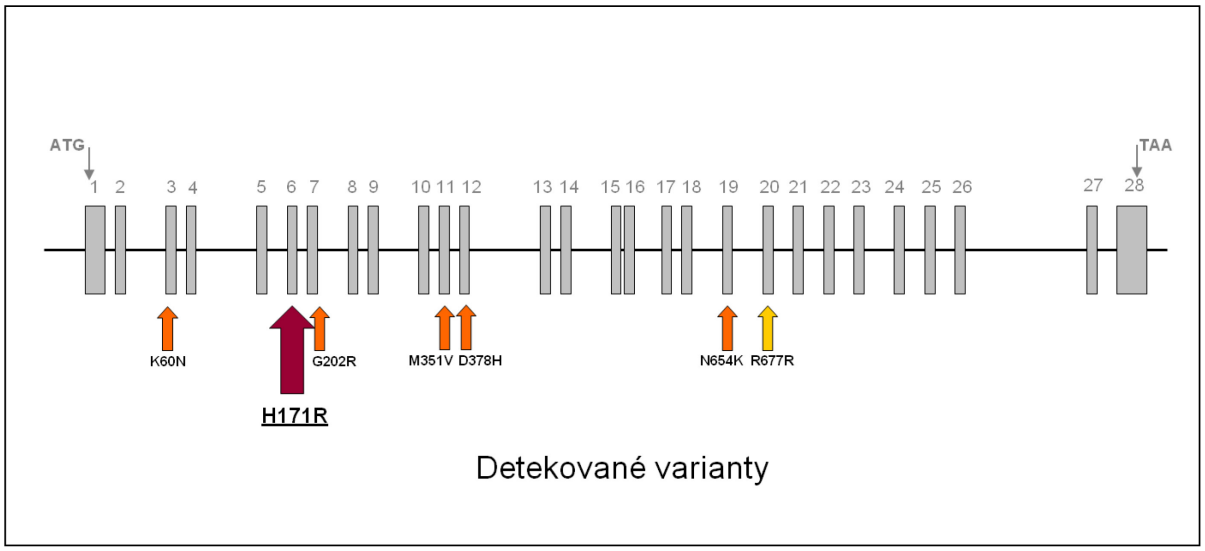
3.9. Statistická analýza

K porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi pacienty a mezi příbuznými s identifikovanou genetickou variantou a bez identifikované genetické varianty jsme použili neparametrický Mannův-Whitneyho test u spojitých proměnných a Fisherův test u kategorických proměnných. Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Ke statistické analýze byl požit program GraphPad PRISM verze 5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA).

4. Výsledky

4.1. Genetické varianty v genu NEBL

Při sekvenování všech kódujících exonů genu *NEBL* jsme v kohortě 95 pacientů identifikovali 6 genetických variant (Obr. 4.1.). Pět z nalezených variant byly známé jednonukleotidové polymorfismy (4 nesynonymní a 1 synonymní), poslední variantou (p.H171R) byl nově objevený nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus.



Obr. 4.1.

Detekované varianty v genu *NEBL* v souboru pacientů s HCM. Známé genetické polymorfismy jsou znázorněny malými šipkami. Nová genetická varianta je zobrazena velkou šipkou.

Všech pět známých jednonukleotidových polymorfismů se v různých frekvencích nacházelo i v kontrolní populaci bez fenotypu jakékoliv kardiomyopatie. Nově objevená varianta p.H171R, nacházející se v sedmém exonu genu *NEBL* nebyla v kontrolní populaci identifikována. Tato varianta způsobuje záměnu hydrofobního a aromatického histidinu za hydrofilní arginin uvnitř čtvrté domény podobné nebulinu (Nebulin-like repeat 4) proteinu nebulette a je vysoce konzervována v ortologních proteinech jiných obratlovců. Dopad této varianty na funkci proteinu byl při predikci pomocí PolyPhen2 označen jako pravděpodobně poškozující a při predikci pomocí MutationTester jako vedoucí k onemocnění.
Nemocný s variantou p.H171R měl stanovenou diagnózu HCM v 53 letech. Šest z pacientových sourozenců souhlasilo s klinickým a genetickým vyšetřením na přítomnost objevené varianty. Nikdo z vyšetřených neměl jasný fenotyp HCM, tři z pacientových bratrů měli hraniční tloušťku stěny levé komory 11 až 12 mm při několikaleté anamnéze léčené arteriální hypertenze. Pacientova sestra (56 let) byla jako jediná z vyšetřených příbuzných nositelkou stejné genetické varianty jako proband, ale neměla fenotyp HCM.

4.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM

V kohortě 48 pacientů s HCM vyšetřených na přítomnost genetických variant v nejčastějších sarkomerických genech *MYH7, MYBPC3, TNNI3* a *TNNT2* jsme nalezli varianty u 19 z nich (40 %). Sedm z těchto pacientů (15 %) byli nositeli známé patogenní mutace, 6 pacientů (13 %) mělo pravděpodobně patogenní mutaci, 3 pacienti (6 %) variantu nejasného významu a 3 pacienti (6 %) variantu v přilehlé části intronu. Všechny identifikované varianty se nacházely v genech *MYBPC3* (13 pacientů, 27 %) a *MYH7* (6 pacientů, 13 %), nenalezli jsme žádné varianty v genech *TNNI3* a *TNNT2*. Při porovnání faktorů se vztahem k přítomnosti mutací, tedy věku v době diagnózy, přítomnosti rodinné anamnézy HCM, maximální hypertrofie levé komory a typu morfologie interventrikulárního septa jsme v naší skupině pacientů nalezli asociaci mladšího věku v době diagnózy a reverzního typu interventrikulárního septa s přítomností patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace (Tab. 4.1.).

	Genotyp +	Genotyp -	OR	95 % CI	P
Věk (roky, IQR)	48 [39,5-55,5]	56 [49-70]			0,028
Pohlaví (muži, %)	46 %	54 %	0,72	0,201-2,590	0,749
Rodinná anamnéza HCM (%)	23 %	6 %	3,35	0,500-22,50	0,320
Maximální LVH (mm, IQR)	22 [16,5-24]	18 [15-20]			0,149
Reverzní septum (%)	56 %	9 %	12,5	1,760-88,78	0,012
Septum sigmoideum (%)	0 %	38 %	0,14	0,007-2,646	0,145
Neutrální septum (%)	44 %	53 %	0,46	0,096-2,211	0,433

Tab. 4.1.

Porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi pacienty s identifikovanou patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutací (Genotyp +) a zbytkem souboru (Genotyp -). Maximální LVH - maximální tloušťka stěny levé komory.

Přítomnost septum sigmoideum byla asociována s vyšším věkem v době diagnózy (medián věku 60 vs. 49 let, IQR 55,75-68,75 vs. 38-59,5, p=0,017), reverzní septum (medián věku 49 vs. 51 let, IQR 26-60 vs. 40-60,5, p=0,540) ani neutrální septum (medián věku 49,5 vs. 59 let, IQR 39-53 vs. 43-63,5, p=0,167) neukázaly statisticky významný vztah k věku v době diagnózy. Zajímavým nálezem bylo, že žádný z pacientů se septum sigmoideum neměl identifikovanou genetickou variantu v nejčastějších sarkomerických genech, zatímco 70 % pacientů s reverzním septem byli nositeli mutace v některém z těchto genů. Při přítomnosti alespoň jednoho z následujících faktorů: rodinná anamnéza HCM, reverzní typ interventrikulárního septa, nejnižší kvartil věku v době diagnózy HCM (<43,5 let) nebo nejvyšší kvartil maximální hypertrofie levé komory (>22 mm) byla patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace identifikována u 48 % pacientů (oproti 27 % z celé kohorty). Pouze u 2 pacientů (4 %) s patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutací jsme nenalezli žádný ze zmíněných faktorů.

4.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM

V kohortě 99 pacientů s HCM vyšetřených na přítomnost genetických variant v nejčastějších sarkomerických genech *MYH7, MYBPC3, TNNI3* a *TNNT2* jsme nalezli 38 variant u 47 pacientů (47 %). Dvacet jedna z těchto pacientů (21 %, jeden složený heterozygot) byli nositeli známé patogenní mutace, 10 pacientů (10 %) mělo pravděpodobně patogenní mutaci, 4 pacienti (4 %) variantu nejasného významu a 12 pacientů (12 %) variantu v přilehlé části intronu. Až polovina z identifikovaných variant se nacházela v genu *MYBPC3*, 34 % v genu *MYH7,* zastoupení genů pro srdeční troponiny bylo podle očekávaní nižší (8 % v genu *TNNI3* a 8 % v genu *TNNT2).*
Ve 21 rodinách se známou patogenní mutací jsme provedli genetické vyšetření 52 příbuzných (18 z nich (35 %) mělo pozitivní genotyp). Dvacet z těchto příbuzných souhlasilo s klinickým vyšetřením včetně echokardiografie (10 jedinců (50 %) z klinicky vyšetřených příbuzných mělo pozitivní genotyp). U klinicky vyšetřených příbuzných jsme po vyřazení 3 jedinců s již přítomnou hypertrofií levé komory nad 12 mm porovnávali klinické a echokardiografické parametry mezi příbuznými s pozitivním a negativním fenotypem. Při malých souborech žádný ze sledovaných parametrů nedosáhl významného rozdílu s výjimkou kombinovaného echokardiografického ukazatele navrženého v práci od Gandjbakhch et al. (Tab. 4.2.) zahrnujícího poměr tloušťky mezikomorového septa a inferolaterální stěny, relativní tloušťku srdeční stěny (poměr součtu tloušťky mezikomorového septa a inferolaterální stěny k rozměru levé komory na konci diastoly) a poměru vrcholové rychlosti časného průtoku mitrální chlopní a vrcholové rychlosti časného diastolického pohybu septálního okraje mitrálního anulu (E/Ea, Gandjbakhch E. et al., 2010).

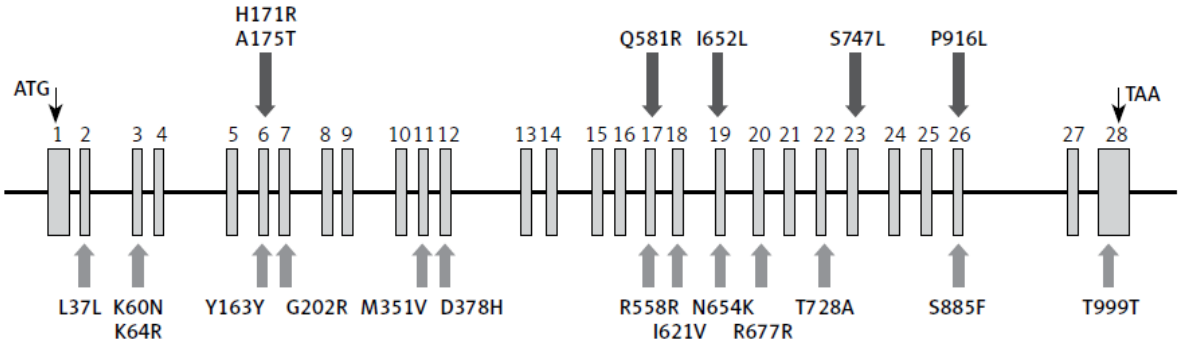
	Genotyp + (n=7)	Genotyp - (n=10)	P
Věk (roky)	31 [24,5-40,5]	25,5 [15,25-56]	0,74
Pohlaví (muži)	29%	70%	0,15
IVS (mm)	9 [8-11]	8,5 [7,75-9,25]	0,52
PWT (mm)	9 [8-10]	8 [7-8,25]	0,20
LVEDD (mm)	43 [40-47]	45 [40,5-47,5]	0,81
IVS/PWT	1 [1-1,1]	1,065 [1-1,133]	0,72
RWT	0,447 [0,333-0,476]	0,369 [0,346-0,422]	0,47
LVEF (%)	65 [64-68,75]	64 [62-66]	0,59
Rozměr levé síně (mm)	30 [29-33]	34,5 [27,75-40,25]	0,35
E (m/s)	0,80 [0,73-0,88]	0,745 [0,53-1,01]	0,73
A (m/s)	0,46 [0,45-0,60]	0,57 [0,495-0,795]	0,40
Septální Ea (cm/s)	11,4 [8,38-11,70]	12,05 [6,525-15]	0,81
Septální Aa (cm/s)	9 [7,3-10,1]	8,145 [6,515-12,65]	0,94
Septální Sa (cm/s)	7,8 [7,1-9,1]	8,9 [8,04-9,7]	0,37
E/Ea	8 [6,5-9,5]	7 [6-9]	0,61
ECHO index Gandjbakhch et al.	3,316 [2,950-3,531]	-0,489 [-1,679-1,827]	**0,01**

Tab. 4.2.
Porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi příbuznými s identifikovanou patogenní mutací (Genotyp +) a zbytkem souboru (Genotyp -). IVS - mezikomorové septum, PWT - tloušťka posterolaterální stěny, LVEDD - rozměr levé komory na konci diastoly, RWT - relativní tloušťka stěny, LVEF - ejekční frakce levé komory, E - vrcholová rychlost časného diastolického průtoku mitrální chlopní, A - vrcholová rychlost pozdního diastolického průtoku mitrální chlopní, Septální Ea - časná diastolická rychlost pohybu septálního okraje mitrálního anulu, Aa - pozdní diastolická rychlost pohybu septálního okraje mitrálního anulu, Sa - systolická rychlost pohybu septálního okraje mitrálního anulu.

5. Diskuze

5.1. Genetické varianty v genu NEBL

V genu *NEBL* jsme identifikovali novou genetickou variantu vedoucí k záměně jedné aminokyseliny u pacienta s typickým fenotypem HCM. Naše výsledky naznačují, že se jedná o patogenní mutaci s kauzálním vztahem ke vzniku onemocnění. Absence námi objevené varianty ve velkém kontrolním souboru bez známek kardiálního onemocnění je faktorem potvrzujícím patogenní úlohu dané varianty. Námi identifikována genetická varianta se nacházela ve vysoce konzervovaném místě napříč mnoha druhy. Záměna aminokyseliny v důsledku změny genetického kódu navíc vedla ke změně polarity bílkoviny v daném místě, což naznačuje dopad na strukturu a funkci proteinu. Gen *NEBL* patří mezi geny kódující sarkomerické proteiny, nebulette je konkrétně součástí Z-disků sarkomer. Geny kódující sarkomerické proteiny tvoří dominantní skupinu postiženou mutacemi u HCM a i geny pro ostatní proteiny Z-disků jsou asociovány se vznikem onemocnění. Roli *NEBL* v etiologii kardiálních onemocnění podporuje i homolog nebulette z kosterního svalu - nebulin, který je asociován s nemalinovou myopatií kosterního svalstva (Pelin K. et al., 1997). V genu *NEBL* byly nalezeny mutace i u jiných pacientů s kardiomyopatiemi. Ve skupině pacientů s DCM byly nalezeny 4 mutace, které se rovněž nacházely v nebulinu podobných modulech (Purevjav E. et al., 2010). Během analýzy našich pacientů s HCM na přítomnost genetických variant v genu *NEBL* proběhlo v rámci mezinárodního projektu souběžně i vyšetření dalších pacientů s kardiomyopatiemi (Perrot A. et al., 2016). Bylo vyšetřeno dalších 122 pacientů s HCM, 148 pacientů s DCM a 24 pacientů s LVNC (celkem tedy 389 nepříbuzných pacientů s kardiomyopatiemi) z různých evropských center na přítomnost genetických variant v genu *NEBL.* Celkově bylo identifikováno 20 genetických variant (Obr. 5.1.). Čtrnáct z nich bylo nalezeno ve frekvencích 1-31 % a bylo označeno za genetické polymorfismy. Naproti tomu 5



Obr. 5.1.

Detekované varianty v genu *NEBL* v souboru pacientů s HCM, DCM a LVNC. Vzácné genetické varianty jsou zobrazeny nad ilustrací genu. Genetické polymorfismy jsou znázorněny pod ilustrací genu.

variant bylo identifikováno vždy pouze u jednoho pacienta (včetně p.H171R u našeho pacienta s HCM) a 1 varianta byla nalezena u dvou nepříbuzných pacientů. Žádná z variant se nenacházela v kontrolní populaci. Identifikované varianty se nacházely s nulovou nebo velmi nízkou alelickou frekvencí v databázích dbSNP a Exome Sequencing Project. Všechny varianty měly odhadovaný poškozující efekt na funkci proteinu v alespoň jednom z

predikčních nástrojů (PolyPhen2 nebo Mutation Taster). Porovnáním sekvence ortologů pro lidský gen *NEBL* se ukázalo, že všechny varianty sdílejí konzervovanost minimálně u savců. Dvě z variant (včetně p.H171R) byly nalezeny u 2 pacientů s HCM, 3 varianty u 4 pacientů s DCM (1 z nich u dvou nepříbuzných pacientů) a poslední varianta u pacienta s LVNC. Celkový výskyt očekávaných patogenních mutací v genu *NEBL* u heterogenního souboru pacientů s kardiomyopatiemi byl 1,8 % (7/389). Přítomnost šesti různých variant u 7 nepříbuzných pacientů s kardiomyopatiemi, které se nenacházely ve velké kontrolní skupině subjektů bez onemocnění srdce činí nepravděpodobnou možnost, že jde o genetické polymorfismy bez kauzálního vztahu ke vzniku onemocnění. Nález mutací způsobujících různé typy familiárních kardiomyopatií v jednom genu je typický pro geny kódující proteiny Z-disků, ale i mnohé další proteiny sarkomery. Všechny geny pro proteiny Z-disků jsou asociovány minimálně s rozvojem dvou různých fenotypů, nejčastěji DCM i HCM. Výsledný fenotyp je pravděpodobně sumou efektu mutace DNA, úprav proteinu, přítomnosti dalších genetických variant, epigenetických mechanizmů a případně i vlivů prostředí. Věk probandů v době diagnózy v jednotlivých rodinách byl mezi 41 a 53 lety, což může ukazovat na výraznou věkově závislou penetranci mutací v genu *NEBL*. V naší rodině s identifikovanou variantou p.H171R neměla sestra probanda ve věku 56 let žádné známky fenotypu HCM, i když byla nositelkou dané varianty. Může se tedy jednat o variantu, která způsobuje hypertrofii levé komory až ve vyšším věku (u probanda byla diagnóza HCM stanovena ve věku 53 let), případně může být její penetrance neúplná, jak tomu bývá i u jiných mutací asociovaných s různými familiárními kardiomyopatiemi. Na základě konzervovanosti postižených míst, předpokládanému dopadu identifikovaných variant, jejich absenci v kontrolní a obecné populaci a předchozím publikacím o efektu příbuzných mutací ve zvířecím modelu předpokládáme jejich úlohu ve vzniku familiárních kardiomyopatií včetně varianty p.H171R identifikované u českého pacienta s HCM. Naše data podporují předpokládaný společný genetický základ familiárních kardiomyopatií a ukazují, že *NEBL* pravděpodobně patří mezi geny asociované s vrozenými onemocněními myokardu. Měl by tak tvořit součást vyšetřovaného panelu genů při genetickém vyšetření pacientů s kardiomyopatiemi, zejména při použití metod NGS schopných efektivně analyzovat velké množství genů paralelně.

5.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM

Limitujícím faktorem klinické použitelnosti genetického vyšetření u HCM je nenalezení žádné mutace u značné části pacientů. Pouze v rodinách s identifikovanou patogenní mutací lze provádět genetické vyšetření příbuzných s vysokou spolehlivostí predikce rozvoje onemocnění (Charron P. et al., 2010). Jednou ze strategií zvyšujících šanci na identifikaci patogenních mutací je selekce pacientů pro genetické vyšetření. Pacienti s rodinnou anamnézou HCM mají vyšší záchyt mutací než nemocní se sporadickou formou (60-70 % versus 10-50 %, Morita H. et al., 2008, Fokstuen S. et al., 2008). V případě HCM jsou ale některé parametry fenotypu rovněž silnými prediktory pozitivního výsledku genetického vyšetření. V práci od Binderové et al. byla na velké skupině pacientů s HCM nalezena silná asociace mezi morfologií interventrikulárního septa a záchytem mutace v sarkomerických genech (Binder J. et al., 2006). Pacienti s reverzní morfologií interventrikulárního septa byli nositeli mutace v sarkomerických genech v téměř 80 % případů, zatímco pacienti se septum sigmoideum měli identifikovanou mutaci v méně než 10 % případů. Další práce zkoumající klinické a echokardiografické parametry u pacientů vyšetřených na přítomnost mutací v 9 sarkomerických genech našla jako nezávislé prediktory pozitivního výsledku genetického vyšetření kromě reverzní morfologie interventrikulárního septa i mladší věk v době diagnózy (pod 45 let), maximální hypertrofii levé komory nad 20 mm a rodinnou anamnézu HCM a

náhlé srdeční smrti (Bos JM. et al., 2014). Negativním prediktorem byla přítomnost arteriální hypertenze. Výsledkem práce je skórovací systém přiřaďující každému pozitivnímu prediktoru 1 bod a odečítající 1 bod při arteriální hypertenzi. Záchyt mutací v celé populaci byl v této studii pouze 34 %, s rozpětím 6 - 80 % podle hodnoty navrženého skóre. Výsledky našeho vyšetření souboru českých pacientů s HCM ukazují podobné vztahy mezi klinickými a morfologickými parametry a zachycenými mutacemi v sarkomerických genech. Nejvyšší podíl pacientů s pozitivním výsledkem genetického vyšetření byl rovněž ve skupině nemocných s reverzní morfologií interventrikulárního septa a na druhou stranu u žádného našeho pacienta se septum sigmoideum jsme nenalezli patogenní mutaci. Vztah pozitivního výsledku genetického vyšetření a maximální hypertrofie levé komory nebo přítomnosti rodinné anamnézy HCM nedosáhl v našem souboru statistické významnosti. Morfologie interventrikulárního septa tak může být v případě HCM v silnější asociaci s mutací v sarkomerických genech než samotný familiární výskyt onemocnění. Pacienti s identifikovanou mutací měli i v našem souboru nižší věk v době diagnózy. Naproti tomu pacienti se septum sigmoideum byli v době diagnózy starší a měli nulový záchyt mutací ve čtyřech nejčastějších sarkomerických genech. U této skupiny pacientů by se tak mohlo jednat více o změnu morfologie levé komory u vnímavých pacientů vlivem věku než o přímý efekt mutace v některém ze sarkomerických genů. Selekce pacientů ke genetickému vyšetření na základě zmíněných klinických a echokardiografických parametrů vede ke zvýšené výtěžnosti při vyšetřování sarkomerických genů s přijatelně malým zastoupením pacientů s patogenní mutací, kteří by pomocí této strategie nebyli vyšetřeni. V našem souboru by se při vyšetření pacientů s alespoň jedním se zmíněných znaků záchyt patogenních mutací významně zvýšil (48 % oproti 27 %) a nedošlo by ke správné identifikaci nosičství patogenní mutace pouze u 4 % pacientů. Při zlepšování dostupnosti moderních metod NGS lze očekávat, že genetické vyšetření bude rutinně indikováno u všech nemocných s HCM i dalšími familiárními kardiomyopatiemi. Selekce na základě klinických a fenotypových znaků ale může být nadále efektivním nástrojem ve volbě modality NGS. Použití cíleného sekvenování s kardiologickými panely obsahujícími sarkomerické geny právě pro iniciální vyšetření pacientů se znaky asociovanými s mutacemi v těchto genech a s rezervováním nákladnějších modalit pro pacienty bez zmíněných fenotypových znaků se může ukázat jako ekonomicky výhodné.

5.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM

Hlavním klinickým využitím genetického vyšetření pacientů s HCM je řízení péče o jejich příbuzné. Vyšetření příbuzných na přítomnost známé mutace v rodině je velmi přesnou a efektivní metodou ovlivňující jejich další péči. Příbuzní s negativním genotypem nemusí být při absenci symptomů dále kardiologicky sledováni. Vyřazení asymptomatického příbuzného s negativním genotypem z dalšího sledování snižuje náklady na zdravotní péči, ale je možné ho provést pouze při jistotě, že identifikovaná genetická varianta je patogenní mutací pro vznik HCM v dané rodině. V situaci, kdy genetické vyšetření nebylo provedeno anebo jím nebyla identifikována patogenní mutace v rodině, podstupují příbuzní probanda klinické kardiologické vyšetření s cílem odhalit jedince s rozvinutým fenotypem HCM. Příbuzní bez známek fenotypu nemohou být vzhledem k penetranci onemocnění stoupající s věkem ujištěni, že nejsou v riziku rozvoje onemocnění. Tito příbuzní jsou pravidelně klinicky sledováni až do věku 50-60 let, kdy penetrance HCM dosahuje svého maxima (Charron P. et al., 2010). Existuje několik studií zabývajících se echokardiografickými parametry schopnými předpovědět genotyp u příbuzných bez vyjádřeného fenotypu HCM. Dobrá diskriminační hodnota s vysokou senzitivitou a specificitou byla prokázána na zvířecích modelech a později i na lidech pro rychlosti pohybu mitrálního anulu na tkáňovém dopplerovském zobrazení.

Pozdějším pracím se ale tuto použitelnost parametrů tkáňového dopplerovského zobrazení nepodařilo potvrdit (Marian AJ., Roberts R. 1994, Marian AJ. et al., 1997, Maron BJ. et al., 2001, Ho CY. et al., 2002, Michels M. et al., 2009). Samotné hodnoty rychlostí pohybu mitrálního anulu v naší kohortě nebyly schopné rozlišit jedince s pozitivním a negativním genotypem. Dalším zkoumaným parametrem v tomto ohledu byl poměr rychlosti časného diastolického průtoku přes mitrální ústí z pulzního dopplerovského vyšetření a časné diastolické rychlosti pohybu septálního okraje mitrálního anulu z tkáňového dopplerovského zobrazení (E/Ea). Tento ukazatel vypovídá o diastolické funkci levé komory a lze jej použít pro odhad jejích plnících tlaků. Jako časný marker diastolické dysfunkce by tak opět mohl identifikovat nositele patogenní mutace ještě před rozvojem hypertrofie levé komory. V našem souboru ani tento ukazatel nebyl významně odlišný mezi skupinami s pozitivním a negativním genotypem. Další práce kombinovala poslední zmiňovaný parametr s morfologickými echokardiografickými proměnnými vyjadřujícími asymetrickou distribuci tloušťky stěny levé komory (poměr tloušťky mezikomorového septa a posterolaterální stěny levé komory) a časné známky remodelace levé komory před rozvojem manifestní hypertrofie (poměr součtu tloušťky mezikomorového septa a posterolaterální stěny k rozměru levé komory na konci diastoly – tedy relativní tloušťka stěny, Gandjbakhch E. et al., 2010). I na malém vyšetřovaném souboru byl tento kombinovaný echokardiografický index dobrým nástrojem k identifikaci genotypu příbuzných, což potvrdily i naše výsledky na jedincích z české populace. I když žádný ze zmiňovaných parametrů nedosahuje v určení genotypu příbuzných přesnosti genetického vyšetření, jejich použitelnost v rodinách bez identifikované patogenní mutace by mohla být v individualizaci intenzity dalšího sledování. Kombinace morfologických i funkčních parametrů v jednom indexu má pravděpodobně větší diskriminační hodnotu, než jednotlivé zmiňované ukazatele.

6. Závěr

Genetické vyšetření je důležitou součástí diagnostiky HCM, nejčastějšího monogenně dědičného onemocnění srdce. Má široké využití od základního výzkumu podílejícího se na objasnění etiologie a patogeneze onemocnění, přes klinický výzkum sledující dopad genetických variant na fenotyp a projevy onemocnění až po použití v klinické praxi, zejména ke genetické diagnostice příbuzných pacientů s HCM. Naše práce se věnovala všem zmíněným možnostem použití genetického vyšetření. Naše výsledky spolu s výsledky spolupracujících center naznačují roli genu *NEBL* kódujícího protein Z-disků kardiomyocytů, nebulette, v etiologii HCM i jiných familiárních kardiomyopatií. Identifikace vzácné genetické varianty v konzervovaném místě genu *NEBL* u pacienta s typickým fenotypem HCM a nepřítomnost této varianty v kontrolní populaci a genetických databázích ukazují, že se pravděpodobně jedná o patogenní mutaci ve vztahu k HCM. Nález variant asociovaných s jinými kardiomyopatiemi v genu *NEBL* potvrzuje společný genetický základ dědičných chorob myokardu. Gen *NEBL* by se tak měl stát součástí vyšetřovaného panelu genů u pacientů s HCM i dalšími kardiomyopatiemi. Vyšetření dobře fenotypově charakterizované skupiny pacientů s HCM na přítomnost genetických variant ve čtyřech nejčastějších sarkomerických genech asociovaných se vznikem onemocnění nám umožnilo identifikovat klinické a echokardiografické ukazatele spojené s vyšší pravděpodobností záchytu patogenní mutace v těchto genech. Nižší věk v době diagnózy a reverzní morfologie interventrikulárního septa jsou prediktory přítomnosti mutace v nejčastějších genech pro HCM a můžou být použity k výběru rozsahu vyšetřovaných genů u dalších pacientů. Konečně genetické vyšetření příbuzných pacientů s HCM nám umožnilo hledat echokardiografické ukazatele schopné identifikovat nositele patogenní mutace před rozvojem fenotypu onemocnění s potenciálním dopadem na řízení jejich další klinické péče. I když žádný ze sledovaných parametrů samostatně nedokázal s dostatečnou přesností určit nositele mutace, kombinovaný echokardiografický index zahrnující morfologické i funkční parametry se ukázal být použitelným nástrojem v situacích bez identifikované patogenní mutace. Metody genetického vyšetření se rychle vyvíjejí a v případě geneticky variabilního onemocnění, jakým je HCM, mají velký potenciál metody NGS schopné paralelního vyšetření většího množství genů. Na identifikaci nových genetických variant u pacientů s HCM bude navazovat jejich klasifikace ve vztahu k onemocnění, nalezení těsnějších korelací mezi genotypem a fenotypem, objasnění modifikujících genetických faktorů a výhledově i predikce klinických důsledků onemocnění na základě genotypu. Všechny tyto faktory povedou k stále častějšímu využívání genetického vyšetření pacientů s HCM jak ve výzkumu, tak v klinické praxi.

7. Literatura

1. Axelsson A, Iversen K, Vejlstrup N et al. Efficacy and safety of the angiotensin II receptor blocker losartan for hypertrophic cardiomyopathy: the INHERIT randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Diabetes Endocrinol 2015;3:123-31.

2. Binder J, Ommen SR, Gersh BJ et al. Echocardiography-guided genetic testing in hypertrophic cardiomyopathy: septal morphological features predict the presence of myofilament mutations. Mayo Clin Proc 2006;81:459–67.

3. Bos JM, Will ML, Gersh BJ et al. Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. Mayo Clin Proc 2014;89:727-37.

4. Cai C, Duan FJ, Yang YJ et al. Comparison of the prevalence, clinical features, and long-term outcomes of midventricular hypertrophy vs apical phenotype in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Can J Cardiol 2014;30:441-7.

5. Cannon L, Yu ZY, Marciniec T et al. Irreversible triggers for hypertrophic cardiomyopathy are established in the early postnatal period. J Am Coll Cardiol 2015;65:560-9.

6. Crilley JG, Boehm EA, Blair E et al. Hypertrophic cardiomyopathy due to sarcomeric gene mutations is characterized by impaired energy metabolism irrespective of the degree of hypertrophy. J Am Coll Cardiol 2003;41:1776-82.

7. Elliott P, Andersson B, Arbustini E et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J 2008;29:270-6.

8. Elliott P, Anastasakis A, Borger MA et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J 2014;35:2733-79.

9. Fokstuen S, Lyle R, Munoz A, et al. A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy. Hum Mutat 2008;29:879–85.

10. Gandjbakhch E, Gackowski A, Tezenas du Montcel S, Isnard R, Hamroun A, Richard P et al. Early identification of mutation carriers in familial hypertrophic cardiomyopathy by combined echocardiography and tissue Doppler imaging. Eur Heart J 2010;31:1599–1607.

11. Gersh BJ, Maron BJ, Bonow RO et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for the Diagnosis and Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy : A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Circulation 2011;124:783-831.

12. Gupte TM, Haque F, Gangadharan B et al. Mechanistic Heterogeneity in Contractile Properties of TPM1 Mutants Associated with Inherited Cardiomyopathies. J Biol Chem 2015;290:7003-15.

13. Guttmann OP, Rahman MS, O'Mahony C et al. Atrial fibrillation and thromboembolism in patients with hypertrophic cardiomyopathy: systematic review. Heart 2014;100:465-72.

14. Ho CY, Sweitzer NK, McDonough B, et al. Assessment of diastolic function with Doppler tissue imaging to predict genotype in preclinical hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 2002;105:2992–2997.

15. Ho CY, Lakdawala NK, Cirino AL et al. Diltiazem treatment for pre-clinical hypertrophic cardiomyopathy sarcomere mutation carriers: a pilot randomized trial to modify disease expression. JACC Heart Fail 2015;3:180-8.

16. Charron P, Arad M, Arbustini E et al. European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of

the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. Eur Heart J 2010;31:2715-26.

17. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. Nature 2014;508:469-76.

18. Marian AJ, Roberts R. Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. Tex Heart Inst J 1994;21:6-15.

19. Marian AJ, Zhao G, Seta Y, et al. Expression of a mutant (Arg92Gln) human cardiac troponin T, known to cause hypertrophic cardiomyopathy, impairs adult cardiac myocyte contractility. Circ Res 1997;81:76–85.

20. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. Circulation 1995;92:785-9.

21. Maron BJ, Niimura H, Casey SA, et al. Development of left ventricular hypertrophy in adults in hypertrophic cardiomyopathy caused by cardiac myosin-binding protein C gene mutations. J Am Coll Cardiol 2001;38:315–321.

22. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies. An American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. Circulation 2006;113:1807-16.

23. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. Lancet 2013;381:242-55.

24. Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG et al. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. Circulation 2006;114:2232 – 2239.

25. Maron MS, Maron BJ, Harrigan C et al.. Hypertrophic cardiomyopathy phenotype revisited after 50 years with cardiovascular magnetic resonance. J Am Coll Cardiol 2009;54:220-8.

26. Maron MS, Olivotto I, Harrigan C et al. Mitral valve abnormalities identified by cardiovascular magnetic resonance represent a primary phenotypic expression of hypertrophic cardiomyopathy. Circulation 2011;124:40-7.

27. Michels M, Soliman OI, Kofflard MJ, et al. Diastolic abnormalities as the first feature of hypertrophic cardiomyopathy in Dutch myosin-binding protein C founder mutations. JACC Cardiovasc Imaging 2009;2:58–64.

28. Moncman CL, Wang K. Nebulette: A 107 kD Nebulin-Like Protein in Cardiac Muscle. Cell Motility and the Cytoskeleton 1995;32:205-225.

29. Moncman CL, Wang K. Architecture of the thin filament-Z-line junction: lessons from Nebulette and Nebulin homologies. Journal of Muscle Research and Cell Motility 2000;21:153-169.

30. Morita H, Rehm HL, Menesses A, et al. Shared genetic causes of cardiac hypertrophy in children and adults. N Engl J Med 2008;358:1899 –908.

31. Mouton J, Loos B, Moolman-Smook JC et al. Ascribing novel functions to the sarcomeric protein, myosin binding protein H (MyBPH) in cardiac sarcomere contraction. Exp Cell Res 2015;331:338-51.

32. Pelin K, Ridanpaa M, et al. Refined localization of the genes for nebulin and titin on chromosom 2q allows the assignment of nebulin as a candidate gene for autosomal recessive nemaline myopathy. Eur J Hum Genet 1997;5:229-234

33. Perrot A, Tomasov P, Villard E et al. Mutations in NEBL encoding the cardiac Z-disk protein nebulette are associated with various cardiomyopathies. Arch Med Sci 2016;12:263-78.

34. Purevjav E, Varela J, Morgado M, et al. Nebulette mutations are associated with dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. J Am Coll Cardiol 2010; 56:1493-502.

35. Ram R, Blaxall BC. Nebulette mutations in cardiac remodeling: big effects from a small mechanosensor. J Am Coll Cardiol 2010; 56: 1503-5.

36. Rangel I, Gonçalves A, de Sousa C et al. Spirito-Maron echocardiographic score: a marker for morphological and physiological assessment of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Echocardiography 2014;31:708-15.

37. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J Mol Biol 1975;94:441-8.

38. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. Br Heart J 1958;20:1–8.

39. Veselka J. Jensen MK, Liebregts M et al. Long-term clinical outcome after alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy: results from the Euro-ASA registry. Eur Heart J 2016;37:1517-23.

40. Yingchoncharoen T, Tang WW. Recent advances in hypertrophic cardiomyopathy. F1000Prime Rep 2014;6:12.

Publikace s přímým vztahem k dizertační práci

Publikace s impakt faktorem:

1. Perrot A, Tomasov P, Villard E, Faludi R, Melacini P, Lossie J, Lohmann N, Richard P, De Bortoli M, Angelini A, Varga-Szemes A, Sperling SR, Simor T, Veselka J, Özcelik C, Charron P. Mutations in NEBL encoding the cardiac Z-disk protein nebulette are associated with various cardiomyopathies. Arch Med Sci 2016;12:263-78. **IF 2,030**

2. Tomasov P, Minarik M, Zemanek D, Cadova P, Homolova S, Curila K, Penicka M, Benesova L, Belsanova B, Gregor P, Veselka J. Genetic testing in the management of relatives of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Folia Biol 2014;60:28-34. **IF 0,778**

3. Tomasov P, Minarik M, Zemanek D, Cadova P, Benesova L, Belsanova B, Veselka J. Clinical and morphological variables influencing the results of genetic testing of patients with hypertrophic cardiomyopathy. Exp Clin Cardiol 2014;20:970-974. **IF 0,758**

Publikace bez přímého vztahu k dizertační práci:

Publikace s impakt faktorem:

1. Veselka J, Tomasov P, Januska J, Krejci J, Dabrowski M, Adlova R. Obstruction after alcohol septal ablation is associated with cardiovascular mortality events. Heart 2016; in press. **IF 5,595.**

2. Veselka J, Jensen MK, Liebregts M, Januska J, Krejci J, Bartel T, Dabrowski M, Hansen PR, Almaas VM, Seggewiss H, Horstkotte D, Tomasov P, Adlova R, Bundgaard H, Steggerda R, Ten Berg J, Faber L. Long-term clinical outcome after alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy: results from the Euro-ASA registry. Eur Heart J 2016;37:1517-23. **IF 15,203**

3. Zemanek D, Tomasov P, Bělehrad M, Hladká K, Košťálová J, Kára T, Veselka J. Comparison of sublingual isosorbide dinitrate and Valsalva maneuver for detection of obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. Arch Med Sci 2015;11:751-5. **IF 2,030**

4. Veselka J, Zemánek D, Jahnlová D, Krejčí J, Januška J, Dabrowski M, Bartel T, Tomašov P. Risk and Causes of Death in Patients After Alcohol Septal Ablation for Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy. Can J Cardiol 2015;31:1245-51. **IF 3,711**

5. Jahnlová D, Tomašov P, Zemánek D, Veselka J. Transatlantic differences in assessment of risk of sudden cardiac death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Int J Cardiol 2015;186:3-4. **IF 4,036**

6. Curila K, Benesova L, Tomasov P, Belsanova B, Widimsky P, Minarik M, Zemanek D, Veselka J, Gregor P. Variants in miRNA regulating cardiac growth are not a common cause of hypertrophic cardiomyopathy. Cardiology 2015;130:137-42. **IF 1,994**

7. Veselka J, Krejci J, Tomasov P, Zemanek D. Long-Term Survival after Alcohol Septal Ablation for Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy: A Comparison with General Population. Eur Heart J 2014;35: 2040-5. **IF 15,203**

8. Veselka J, Hájek P, Tomašov P, Tesař D, Brůhová H, Matějovič M, Branny M, Studenčan M, Zemánek D. Effect of rosuvastatin therapy on troponin I release following percutaneous coronary intervention in nonemergency patients (from the TIP 3 study). Am J Cardiol 2014;113:446-51. **IF 3,425**

9. Spacek M, Zemanek D, Tomasov P, Veselka J. Early opening of dormant septal collaterals during alcohol septal ablation: a possible hazard of remote necrosis. Can J Cardiol 2013;29:1531.e5-7. **IF 3,122**

10. Zemánek D, Branny M, Martinkovičová L, Hájek P, Malý M, Tesař D, Tomašov P, Veselka J. Effect of seven-day atorvastatin pretreatment on the incidence of periprocedural myocardial infarction following percutaneous coronary intervention in patients receiving long-term statin therapy. A randomized study. Int J Cardiol 2013;168:2494-7. **IF 5,509**

11. Veselka J, Tomasov P, Zemánek D. Mid-term outcomes of alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy in patients with sigmoid versus neutral ventricular septum. J Invasive Cardiol 2012;24:636-40. **IF 1,841**

12. Veselka J, Zimolová P, Martinkovičová L, Tomašov P, Hájek P, Malý M, Spaček M, Zemánek D, Tesař D. Comparison of mid-term outcomes of carotid artery stenting for moderate versus critical stenosis. Arch Med Sci 2012;8:75-80. **IF 1,214**

13. Veselka J, Hájek P, Malý M, Zemánek D, Adlová R, Tomašov P, Martinkovičová L,Tesař D, Cervinka P. Predictors of coronary intervention-related myocardial infarction in stable angina patients pre-treated with statins. Arch Med Sci 2011;7:67-72. **IF 1.199**

14. Veselka J, Cadova P, Tomasov P, Theodor A, Zemanek D. Dual-source CT angiography for detection and quantification of in-stent restenosis in the left main coronary artery: comparison with intracoronary ultrasound and coronary angiography. J Invasive Cardiol 2011;23:460-4. **IF 1,782**

15. Veselka J, Tomašov P, Zemánek D. Long-term effects of varying alcohol dosing in percutaneous septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy: a randomized study with a follow-up up to 11 years. Can J Cardiol 2011;27:763-7. **IF 2,224**

16. Veselka J, Malý M, Zemánek D, Hájek P, Martinkovicová L, Tomašov P. Effect of MGuard net protective stent on the release of troponin I in patients with acute coronary syndromes. A randomized controlled trial. Int Heart J 2011;52:203-6. **IF 1,272**

17. Zemánek D, Tomasov P, Homolová S, Linhartová K, Veselka J. Sublingual isosorbide dinitrate for the detection of obstruction in hypertrophic cardiomyopathy. Eur J Echocardiogr 2011;12:684-7. **IF 2,394**

18. Veselka J, Zimolová P, Špaček M, Hájek P, Malý M, Tomašov P, Martinkovičová L, Zemánek D. Comparison of carotid artery stenting in patients with single versus bilateral carotid artery disease and factors affecting midterm outcome. Ann Vasc Surg 2011;25:796-804. **IF 1,332**

19. Veselka J, Zemánek D, Hájek P, Malý M, Adlová R, Martinkovičová L, Tomašov P, Tesař D. Effect of two-day atorvastatin pretreatment on long-term outcome of patients with stable angina pectoris undergoing elective percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol 2011;107:1295-9. **IF 3,68**

20. Tomasov P, Linhartova K, Antonova P, Adlova R, Alan D, Veselka J. Combined percutaneous treatment of atrial septal defect and pulmonic or aortic stenosis in adult patients. Arch Med Sci 2010;6:976-80. **IF 1,012**

21. Zemánek D, Tomašov P, Přichystalová P, Linhartová K, Veselka J. Evaluation of the right ventricular function in hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a strain and tissue Doppler study. Physiol Res 2010;59:697-702. **IF 1,43**

22. Veselka J, Zemánek D, Tomasov P, Homolová S, Adlová R, Tesar D. Complications of low-dose, echo-guided alcohol septal ablation. Catheter Cardiovasc Interv 2010;75:546-50. **IF 2,363**

23. Maly M, Hrachovinova I, Tomasov P, Salaj P, Hajek P, Veselka J. Patients with acute coronary syndromes have low tissue factor activity and microparticle count, but normal concentration of tissue factor antigen in platelet free plasma: a pilot study. Eur J Haematol 2009;82:148-53. **IF 2,237**

24. Posch MG, Thiemann L, Tomasov P, Veselka J, Cardim N, Garcia-Castro M, Coto E, Perrot A, Geier C, Dietz R, Haverkamp W, Ozcelik C. Sequence analysis of myozenin 2 in 438 European patients with familial hypertrophic cardiomyopathy. Med Sci Monit 2008;14:CR372-4. **IF 1,607**

25. Malý MA, Tomasov P, Hájek P, Blasko P, Hrachovinová I, Salaj P, Veselka J. The role of tissue factor in thrombosis and hemostasis. Physiol Res 2007;56:685-95. **IF 1,43**

Publikace bez impakt faktoru:

1. Kapitola v monografii: Brdička R, Didden W. Genetika v klinické praxi. GHC Genetics, Praha, 2015

2. Tomašov P. Genetika kardiomyopatií. Kardiol Rev Int Med 2015;17:15-19.

3. Tomašov P. Klasifikace a genetika kardiomyopatií. Kardiol Prax 2011;9:119-123.

4. Tomašov P. Genetika kardiomyopatií. Cor Vasa 2010;52:399–402.