

**Univerzita Karlova v Praze**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka



**MUDr. Pavol Tomašov**

Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie se zaměřením na genetické vyšetření

Diagnostics of hypertrophic cardiomyopathy with emphasis on genetic testing

Dizertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Josef Veselka, CSc.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 15.06.2016

Pavol Tomašov

Podpis

Identifikační záznam:

TOMAŠOV, Pavol. *Diagnostika hypertrofické kardiomyopatie se zaměřením na genetické vyšetření. [Diagnostics of hypertrophic cardiomyopathy with emphasis on genetic testing]*. Praha, 2016. 86 stran. Dizertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Kardiologická klinika. Školitel Veselka, Josef.

## Abstrakt

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 nebulin.
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 našli 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 našli významnou asociaci mezi nižším věkem v době diagnózy a reverzním typem interventrikulárního 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.

Klíčová slova: Onemocnění myokardu, Hypertrofická kardiomyopatie, Genetické vyšetření

## 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 nebullette 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.

**Key words:** Myocardial diseases, Hypertrophic cardiomyopathy, Genetic testing

**Poděkování:**

Děkuji panu profesoru Josefu Veselkovi a panu Andreasu Perrotovi za odborné rady a vedení při provádění vědeckého projektu a přípravě disertační práce. Rovněž děkuji spolupracovníkům z Kardiologické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole v Praze a z Kardiogenetické laboratoře Univerzitní nemocnice Charité v Berlíně za spolupráci na projektu.

V Praze 15.06.2016

Pavol Tomašov

## Obsah

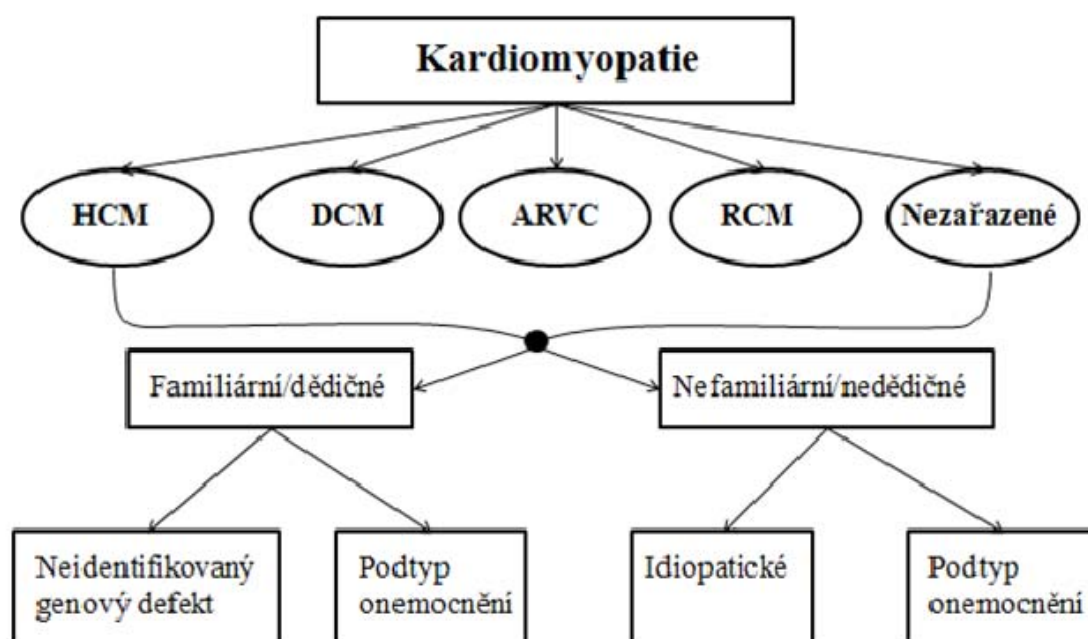
1. Úvod.....	9
1.1. Definice hypertrofické kardiomyopatie.....	10
1.2. Historie.....	10
1.3. Epidemiologie.....	11
1.4. Etiologie.....	11
1.5. Patofyziologie.....	14
1.6. Fenotyp.....	15
1.7. Klinické důsledky.....	25
1.8. Diagnostika.....	26
1.9. Léčba.....	42
2. Cíle práce.....	47
3. Metody.....	49
3.1. Populace.....	49
3.2. Kardiologické vyšetření.....	50
3.3. Echokardiografické vyšetření.....	50
3.4. Výběr kandidátního genu.....	51
3.5. Odběr vzorků pro genetické vyšetření a izolace DNA.....	54
3.6. Amplifikace DNA.....	54
3.7. Sekvenování.....	55
3.8. Genetická analýza.....	56
3.9. Statistická analýza.....	56
4. Výsledky.....	57
4.1. Genetické varianty v genu NEBL.....	57
4.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM.....	60
4.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM.....	63
5. Diskuze.....	68
5.1. Genetické varianty v genu NEBL.....	68
5.2. Vztah klinických a echokardiografických parametrů a výsledků genetického vyšetření pacientů s HCM.....	72

5.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM.....	74
6. Závěr.....	77
Literatura.....	79



## 1. Úvod

Kardiomyopatie jsou heterogenní skupinou onemocnění myokardu, definovanou jako stavy se strukturálním anebo funkčním poškozením srdečního svalu při absenci ischemické choroby srdeční (ICHS) a abnormálních hemodynamických podmínek schopných způsobit dané postižení (Maron BJ. et al., 2006, Elliott P. et al., 2008). I přes různorodost v etiologii, patofyziologických mechanismech a klinických důsledcích umožňuje postižení srdečního svalu u kardiomyopatií klasifikaci těchto onemocnění do několika málo kategorií podle dominantního morfologického a funkčního obrazu nemocného srdce. Podle klasifikace Evropské kardiologické společnosti (European Society of Cardiology, ESC) tak rozeznáváme hypertrofickou (HCM), dilatační (DCM), arytmogenní (ARVC), restriktivní (RCM) a ve skupině nezařazených také nonkompaktní (LVNC), Tako-tsubo a tachykardií indukovanou kardiomyopatii (Obr. 1.1., Elliott P. et al., 2008).



Obr. 1.1.

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

Dědičnost kardiomyopatií hraje důležitou roli v jejich etiologii, některé z kardiomyopatií jsou primárně genetické poruchy (jde o monogenně dědičná onemocnění), jiné mají smíšenou etiologii, včetně genetické a toto rozdělení je i součástí klasifikačního schématu kardiomyopatií (Obr. 1.1., Elliott P. et al., 2008). 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. Navzdory velkému pokroku v této oblasti zůstává mnoho nezodpovězených otázek a genetické vyšetření zatím pouze v malé míře ovlivňuje terapeutické rozhodování u pacientů s kardiomyopatiemi.

### 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

HCM byla poprvé popsána britským patologem Tearem v roce 1958 na sérii pitevních kazuistik 8 mladých lidí s asymetrickou hypertrofií levé komory srdeční a s atypickým uspořádáním svalových vláken, přičemž 7 z nich zemřelo náhlou smrtí a často měli i rodinnou anamnézu náhlé smrti (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 (Maron BJ. et al., 1995, Maron BJ, Maron MS., 2013). Historicky se pro označení onemocnění používalo velké množství různých názvů, které vyjadřovaly jednotlivé morfologické i funkční aspekty srdečního postižení u HCM, nakonec se ustálil výraz hypertrofická kardiomyopatie, zdůrazňující univerzální vlastnost tohoto onemocnění, která je i součástí definice ESC (Elliott P. et al., 2014) i amerických kardiologických společností (American College of Cardiology Foundation a American Heart Association, ACCF/AHA, Gersh BJ. et al., 2011).

### 1.3. Epidemiologie

Metodologicky rozdílné práce udávají výskyt nevysvětlené hypertrofie levé komory srdeční v různých dospělých populacích mezi 0,02 a 0,23 % (Hada Y. et al., 1987, Codd MB. et al., 1989, Maron BJ., et al., 1995, Corrado D. et al., 1998, Nistri S. et al., 2003, Zou Y. et al., 2004, Maro EE. et al., 2006). Pravděpodobně nej přesnější údaje o prevalenci onemocnění poskytují studie vyšetřující neselektované populace metodou, která dokáže s velkou přesností zobrazit fenotyp, v případě HCM pomocí echokardiografie. Díky těmto pracím se za prevalenci HCM považuje hodnota 1:500 (Maron BJ. et al., 1995). Nebyly identifikovány významné rasové rozdíly ve výskytu HCM.

### 1.4. Etiologie

Klinická definice HCM je založena na přítomnosti hypertrofie levé komory nevysvětlitelné hemodynamickými podmínkami. HCM jako nemoc naplňující tuto definici 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 (Elliott P. et al., 2014, Gersh BJ. et al., 2011). Jako první byla identifikována mutace v genu pro těžký řetězec  $\beta$  myozinu (Jarcho JA. et al., 1989, Geisterfer-Lowrance AA. et al., 1990), následně bylo nalezeno velké množství dalších mutací (Maron BJ, Maron MS., 2013). V současnosti je se vznikem HCM asociováno více než 2000 mutací v alespoň 20 různých genech (Tab. 1.1., Yingchoncharoen T., Tang WW., 2014). Část publikovaných mutací je nalezena pouze v jedné rodině, prevalence jiných je výrazně vyšší, což je nejlépe patrné na částečně izolovaných populacích, jako například dominance jednoho typu mutace u islandských pacientů s HCM (Adalsteinsdottir B. et al., 2014). Většina pacientů (přes 80 %) s pozitivním genetickým vyšetřením má mutaci v jednom ze dvou genů (gen *MYH7* pro těžký řetězec  $\beta$  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 s různým typem dědičnosti (Tab. 1.2.) a vzácně u některých získaných

Gen	Protein	Četnost identifikace mutací u pacientů s HCM
MYH7	Těžký řetězec $\beta$ myozinu	25 – 35 %
MYBPC3	Myozin vazebný protein C	20 – 30 %
TNNT2	Srdeční troponin T	3 – 5 %
TNNI3	Srdeční troponin I	<5 %
TPM1	$\alpha$ tropomyozin	<5 %
MYL2	Regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu	<5 %
MYL3	Esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu	vzácná
ACTC	$\alpha$ aktin	vzácná
TTN	Titin	vzácná
TNNC1	Srdeční troponin C	vzácná
MYH6	Lehký řetězec $\alpha$ myozinu	vzácná
CSRP6	Svalový LIM protein	vzácná
MYLK2	Kináza lehkého řetězce myozinu 2	vzácná
LDB3	LIM vázající doména 3	vzácná
TCAP	Teletonin	vzácná
VCL	Vinkulin/metavinkulin	vzácná
ACTN2	$\alpha$ aktinin 2	vzácná
PLN	Fosfolamban	vzácná
MYOZ2	Myozenin 2	vzácná
JPH2	Junktofilin 2	vzácná

Tab. 1.1.

Zastoupení jednotlivých genů asociovaných s HCM (Yingchoncharoen T., Tang WW., 2014).

onemocnění. V minulosti byly tyto nemoci označovány jako fenokopie HCM, ale podle aktuální klasifikace ESC splňují definici HCM (Elliott P. et al., 2008). V klasifikaci ACCF/AHA jsou tyto nemoci vzhledem k častému poškození i jiných orgánových systémů kromě srdce označovány jako sekundární kardiomyopatie (Maron BJ. et al., 2006).

Některé vrozené poruchy metabolismu jsou asociovány s hypertrofií levé komory srdeční. Většina těchto chorob se přenáší jako autozomálně recesivní znak, u některých je přenos gonozomální. U dospělých pacientů s HCM je nejčastěji zastoupena Andersonova-Fabryho nemoc s mutací v genu pro  $\alpha$ -galaktozidázu A a poškození genu *PRKAG2* ( $\gamma$ -2 regulační podjednotka AMP-aktivované protein kinázy). Obě nemoci mají prevalenci v kohortách dospělých pacientů s HCM kolem 1 % (Elliott P. et al., 2011, Murphy RT. et al., 2005). Další vrozené poruchy metabolismu (jako Danonova nemoc s mutací v genu *LAMP2* pro

Gen	Protein	Četnost u pacientů s HCM	Asociovaný fenotyp
PRKAG2	$\gamma$ -2 regulační podjednotka AMP-aktivované protein kinázy	1 %	Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom, předvodní poruchy
GLA	$\alpha$ -galaktozidáza A	1 %	Andersonova-Fabryho nemoc
GAA	$\alpha$ -1, 4-glukozidáza	vzácná	Pompeho nemoc
AGL	Amylo-1, 6-glukozidáza	vzácná	Forbesova nemoc
LAMP2	Lyzosomální membránový protein 2	vzácná	Danonova nemoc
Mitochondriální geny	Proteiny respiračního řetězce	vzácná	Mitochondriální kardiomyopatie
PTPN11	Protein tyrozinová fosfatáza, typ 11	vzácná	LEOPARD syndrom, Noonanové syndrom
FRDA	Frataxin	vzácná	Friedreichova ataxie

Tab. 1.2.

Příklady postižení genů u dalších onemocnění, součástí kterých je i fenotyp HCM (Yingchoncharoen T., Tang WW., 2014).

lyzosomální membránový protein 2 a Pompeho nemoc s mutací v genu *GAA* pro  $\alpha$ -1, 4-glukozidázu) jsou častější u dětské populace (Charron P. et al., 2004).

Mitochondriální kardiomyopatie jsou dědičné poruchy s mutacemi v mitochondriální nebo nukleární DNA s různým typem přenosu. Nejčastěji u nich dochází k poruše součástí mitochondriálního respiračního řetězce a projevují se variabilním klinickým obrazem, včetně HCM (Limongelli G. et al., 2012).

Neuromuskulární poruchy pouze vzácně způsobují fenotyp HCM, výjimkou je Friedreichova ataxie s mutacemi v genu *FRDA* pro frataxin a ze svalových dystrofií a vrozených myopatií nemalinová myopatie (mutace v genu pro nebulin) a myopatie s mutací v genu *FHL1* (four-and-half LIM domain 1, Filla A. et al., 1996, Limongelli G. et al., 2013).

Mezi projevy několika vrozených syndromů patří i fenotyp HCM. Nejčastěji jde o poruchy signalizační cesty Ras/mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), kam patří syndrom Noonanové, Costellův a LEOPARD syndrom (Wilkinson JD. et al., 2012, Sarkozy A. et al., 2008, Lin AE. et al., 2002). Opět jde o nemoci diagnostikované většinou již v dětství, mírnější

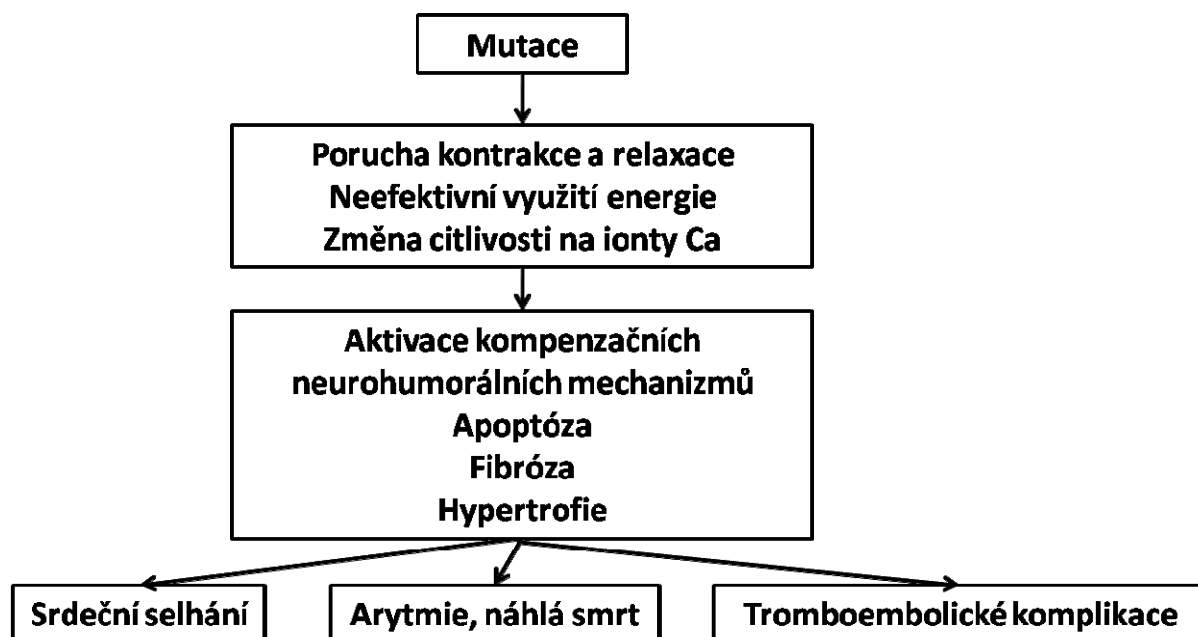
formy ale mohou být rozpoznány až v dospělosti, případně až při genetickém vyšetření pacientů s HCM.

Srdeční amyloidóza způsobuje typický obraz RCM, ale protože u ní často dochází i k hypertrofii levé komory srdeční, je tato nemoc v klasifikaci ESC zařazena i v diferenciální diagnostice HCM (Elliott P. et al, 2008). Edém myokardu u myokarditidy může napodobit echokardiografický obraz HCM, ale jde většinou o přechodný nálezn, který spolu s ostatními klinickými a laboratorními známkami nečiní potíže při rozlišení těchto onemocnění (Hiramitsu S. et al., 2001).

Endokrinní poruchy mohou rovněž způsobit hypertrofii myokardu (často s ústupem po léčbě), jak k tomu dochází u novorozenců diabetických matek nebo u pacientů s feochromocytomem nebo akromegalií (Ullmo S. et al., 2007, Huddle KR. et al., 1996, Hradec J. et al., 1988). Chronické užívání některých léků jako kortikosteroidů nebo takrolimu může vést k mírné hypertrofii levé komory srdeční, která zřídka dosáhne hodnoty 15 mm (Jarzembowski TM. et al., 2005).

### 1.5. Patofyziologie

Patofyziologické mechanismy u klasické HCM, zapříčiněné mutacemi v genech pro sarkomerické proteiny, vedoucí od genetické poruchy k hypertrofii a změně organizaci sarkomer a kardiomyocytů a rozvoji fibrózy myokardu, nejsou detailně objasněny. Předpokládá se neefektivní energetické využití ATP s následnou hypertrofií jako kompenzačním mechanismem, změněná citlivost na ionty kalcia při regulaci kontrakce a relaxace i zvýšená apoptóza kardiomyocytů s následnou fibrózou (Obr. 1.2., Crilley JG. et al., 2003, Gupte TM. et al., 2015). Například mutace v genu pro tropomyozin vedoucí ke zvýšené citlivosti na ionty kalcia způsobují rozvoj fenotypu HCM, ale mutace vedoucí ke snížené citlivosti na ionty kalcia (a následně trvající inhibici interakce aktinu a myozinu molekulou tropomyozinu) způsobují rozvoj fenotypu DCM (Chang AN. et al., 2014). Pacienti s HCM mají v periferní krvi vyšší počty cirkulujících mezenchymálních kmenových buněk, které rovněž mohou hrát roli při vzniku fibrózy myokardu (Marketou ME. et al., 2015). Kromě hypertrofie jsou častým fenotypovým znakem HCM i strukturální abnormality cípů mitrální chlopně, což potvrzuje i knock-out zvířecí model pro gen *MYBPC3* (Judge DP. et al., 2015). Mediátorem těchto změn je pravděpodobně transformační růstový faktor beta (TGF- $\beta$ ). Penetrance mutací je u HCM (jako i jiných kardiomyopatií) závislá na věku, rozvoj



Obr. 1.2.

Předpokládané patofyziologické mechanismy vedoucí od mutace k fenotypu a klinickým důsledkům HCM.

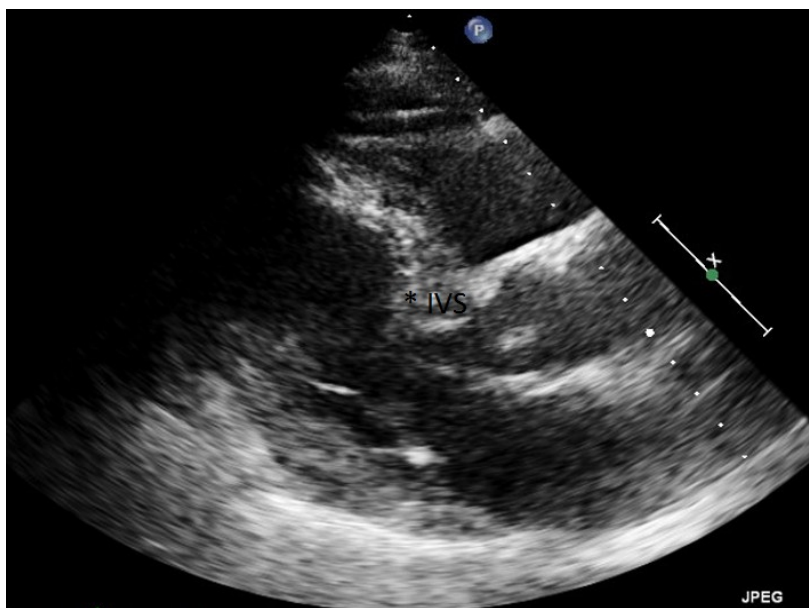
hypertrofie levé komory stoupá do 60 let, kdy dosahuje až 95 % (Watkins H. et al., 1992, Van Driest SL. et al., 2002). Účinek mutace na vznik fenotypu je ale přitom dán pravděpodobně již velmi časně. Na modelu transgenních myší s mutací způsobující HCM v genu pro těžký řetězec  $\beta$  myozinu vedlo farmakologické potlačení exprese tohoto genu k prevenci vzniku fenotypu jenom v případě, že bylo provedeno v časném postnatálním období (Cannon L. et al., 2015). To je jedno z možných vysvětlení malého účinku preventivní léčby k zabránění rozvoji hypertrofie u nositelů genotypu HCM. Velká genetická variabilita HCM je pravděpodobně jedním z důvodů velké variability fenotypu a klinických projevů onemocnění.

## 1.6. Fenotyp

V mikroskopickém obraze je HCM charakterizována hypertrofií sarkomér a kardiomyocytů a jejich chaotickým uspořádáním. Dalšími známkami jsou fibróza myokardu a postižení mikrovaskulatury. Žádná z těchto známek není pro HCM specifická, a proto se v diagnostice onemocnění rutinně nepoužívá endomyokardiální biopsie (Maron BJ. et al., 1981, Fujiwara H. et al., 1979, Becker AE., Caruso G., 1982).

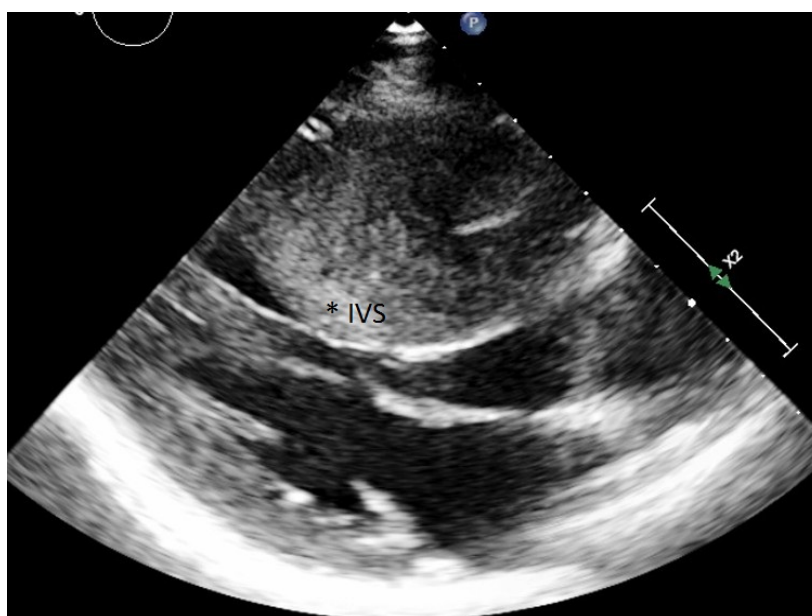
Makroskopicky vede HCM k vývoji základního znaku tohoto onemocnění tedy hypertrofie levé komory srdeční nevysvětlitelné hemodynamickými podmínkami. Míra hypertrofie levé komory je u pacientů s HCM velmi variabilní, od mírné hypertrofie až po extrémní hodnoty výrazně převyšující hypertrofii pozorovatelnou u nemocí se změněnými hemodynamickými podmínkami jako jsou arteriální hypertenze nebo chlopenní vady. Lokalizace hypertrofie je rovněž variabilní a může být vyjádřena ve kterémkoliv segmentu levé komory, nejčastěji je postižena bazální část interventrikulárního septa a přední stěny (Maron MS. et al., 2009, Rangel I. et al., 2014, Cai C. et al., 2014). Apikální forma HCM s největší prevalencí v asijské populaci je označení pro dominantní postižení apikálních segmentů levé komory (Kitaoka H. et al., 2003). Podle tvaru interventrikulárního septa a dutiny levé komory lze celkovou morfologii postižení rozdělit do čtyř kategorií - septum sigmoideum s konkávní plochou septa směrem do dutiny levé komory (Obr. 1.3.), reverzní septum vyklenující se do dutiny levé komory konvexní plochou (Obr. 1.4.. 1.5.), neutrální septum bez výrazně konvexní či konkávní plochy (Obr. 1.6.) a zmíněná apikální forma HCM (Obr. 1.7., Binder J. et al., 2006). Toto dělení má vztah k záchytu mutací v genech pro sarkomerické proteiny (viz genetické vyšetření). Do obrazu onemocnění rovněž patří hypertrofie a morfologické abnormality papilárních svalů levé komory (Obr. 1.8., Harrigan CJ. et al., 2008). U menšiny pacientů je patrna i hypertrofie pravé komory, ale k hypertrofii síní nedochází (Nagata Y. et al., 2015, Hayashi H. et al., 2014). Kromě přítomnosti mutace je pro rozvoj hypertrofie tedy pravděpodobně důležitý i afterload (dotížení), proti kterému daný srdeční oddíl pracuje. U pacientů s HCM dochází i k prodloužení obou cípů mitrální chlopně, které poté hrají roli při vzniku nitrokomorové obstrukce a mitrální insuficience (Obr. 1.9., Maron MS. et al., 2011). Hypertrofická levá komora pacientů s HCM má většinou dobrou systolickou funkci s normální nebo až supranormální ejekční frakcí, u části pacientů dochází téměř k obliteraci dutiny levé komory během systoly. Citlivější detektory systolické dysfunkce jako jsou rychlosti longitudinálního pohybu myokardu a deformační echokardiografické parametry (strain a strain rate) jsou ale abnormální i u nemocných bez poklesu ejekční frakce (Urbano-Moral JA. et al., 2014). U menšiny pacientů dochází během trvání onemocnění k rozvoji těžké systolické dysfunkce a remodelaci levé komory, tento stav se často označuje jako “burnt-out” nebo “end-stage” stádium HCM (Obr. 1.10., Melacini P. et al., 2010). Běžným důsledkem hypertrofické levé komory se sníženou poddajností je ale diastolická dysfunkce různého stupně, která vede k projevům srdečního selhání. Jedním z důsledků diastolické dysfunkce levé komory je i zvětšení levé síně, na kterém se může podílet i mitrální insuficience při abnormalitách cípů mitrální chlopně (Obr. 1.11., Nistri S. et al., 2006). Zvětšení levé síně





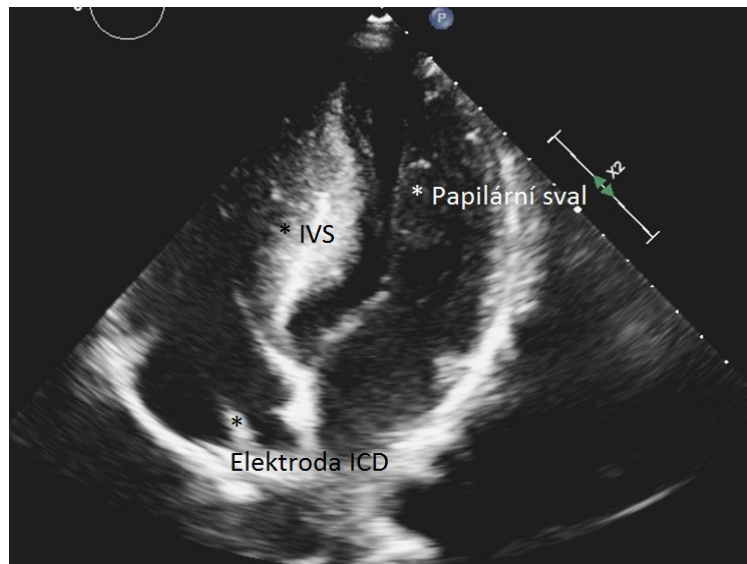
Obr. 1.3.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu. Je patrné hypertrofické interventrikulární septum morfologie septum sigmoideum s maximem hypertrofie v bazální části a s konkávní plochou směrem do dutiny levé komory. IVS - interventrikulární septum.



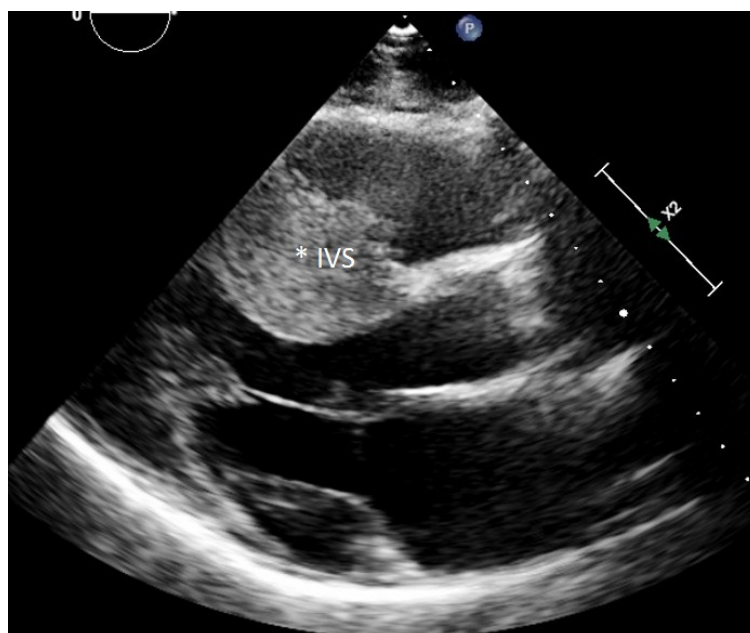
Obr. 1.4.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu. Je patrné výrazně hypertrofické interventrikulární septum reverzní morfologie s konvexní plochou směrem do dutiny levé komory. IVS - interventrikulární septum.



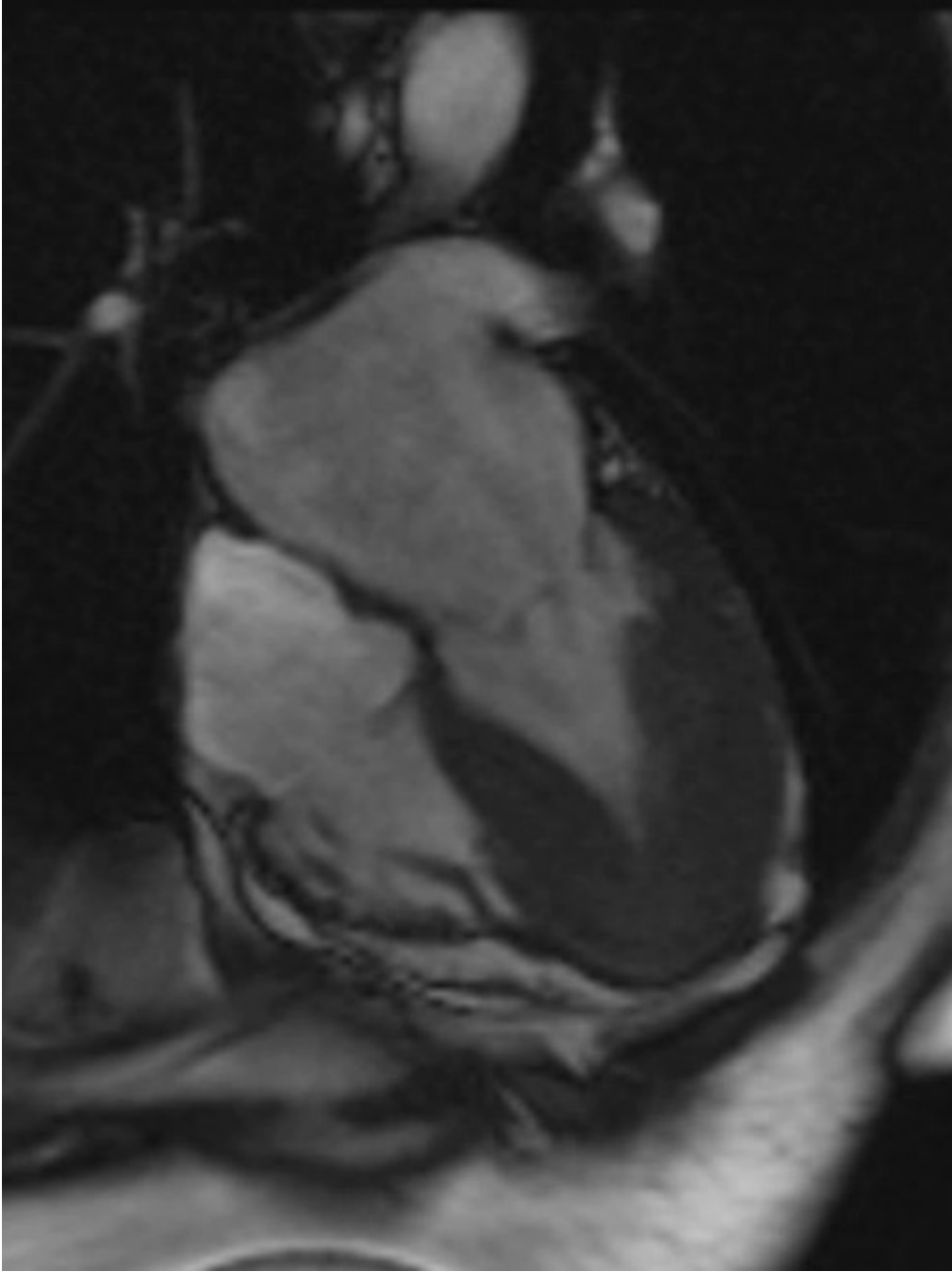
Obr. 1.5.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce. Je patrné výrazně hypertrofické interventrikulární septum reverzní morfologie vyklenující se do dutiny levé komory. Rovněž je zobrazen hypertrofický anterolaterální papilární sval a v pravé síni je patrná elektroda implantabilního kardioverteru-defibrilátoru, která dále pokračuje do pravé komory. IVS - interventrikulární septum, ICD - implantabilní kardioverter-defibrilátor.



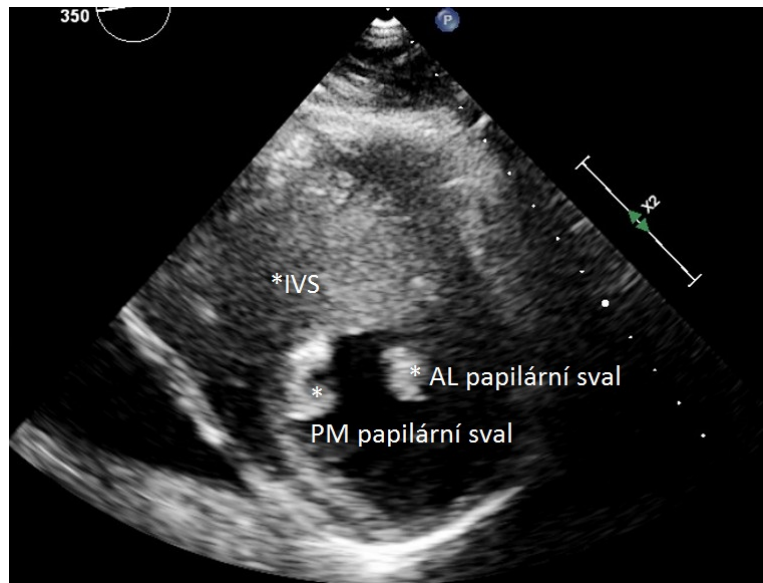
Obr. 1.6.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu. Je patrné hypertrofické interventrikulární septum neutrální morfologie bez dominantní konvexity nebo konkavity směrem do dutiny levé komory. IVS - interventrikulární septum.



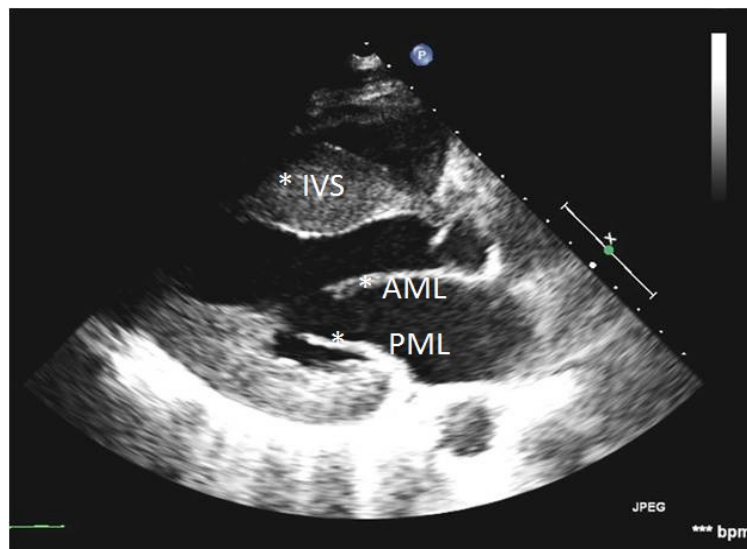
Obr. 1.7.

Magnetická rezonance srdce u nemocné s apikální formou HCM. Je patrna hypertrofie apikálních a středních segmentů levé komory, bez výrazné hypertrofie bazálních segmentů. Rovněž je patrna dilatace levé síně.



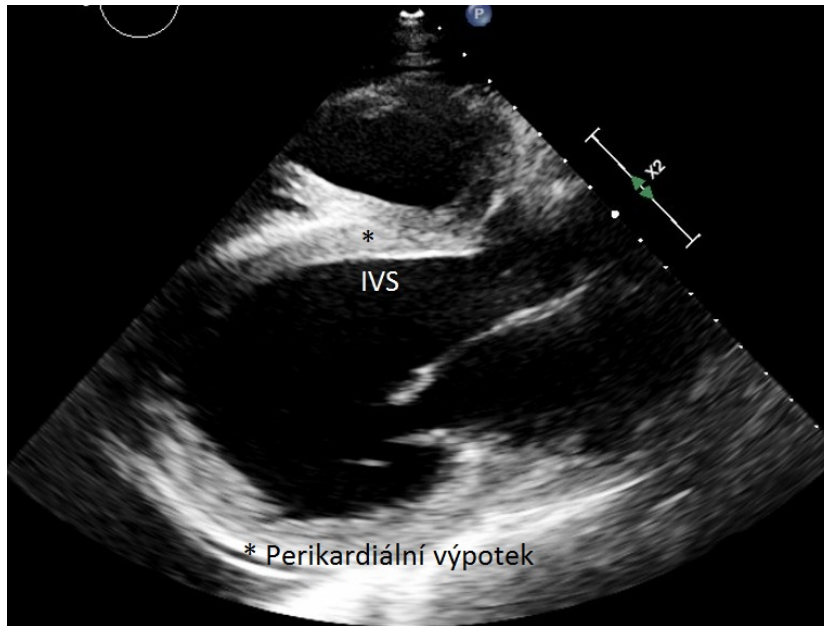
Obr. 1.8.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na krátkou osu v úrovni papilárních svalů. Je patna hypertrofie obou papilárních svalů a bifidní posteromediální papilární sval. Rovněž je zobrazena výrazná hypertrofie interventrikulárního septa. IVS - interventrikulární septum, PM - posteromediální papilární sval, AL - anterolaterální papilární sval.



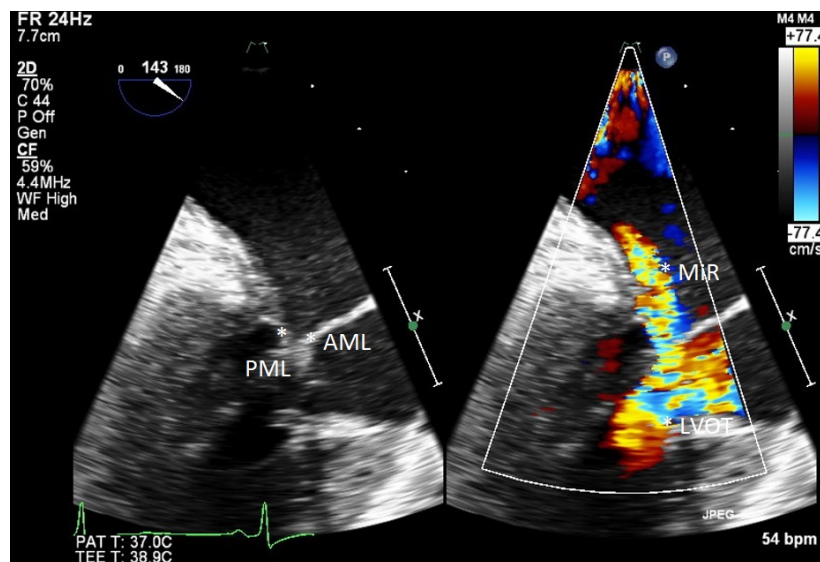
Obr. 1.9.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu. Je patno prodloužení obou cípů mitrální chlopně a hypertrofie levé komory. IVS - interventrikulární septum, AML - přední cíp mitrální chlopně, PML - zadní cíp mitrální chlopně.



Obr. 1.10.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu u pacientky s “end-stage” HCM. Je zobrazena dilatovaná, kulovitě remodelovaná, hypertrofická levá komora s těžkou systolickou dysfunkcí. Patrný je i stopový perikardiální výpotek za posterolaterální stěnou levé komory. IVS - interventrikulární septum.



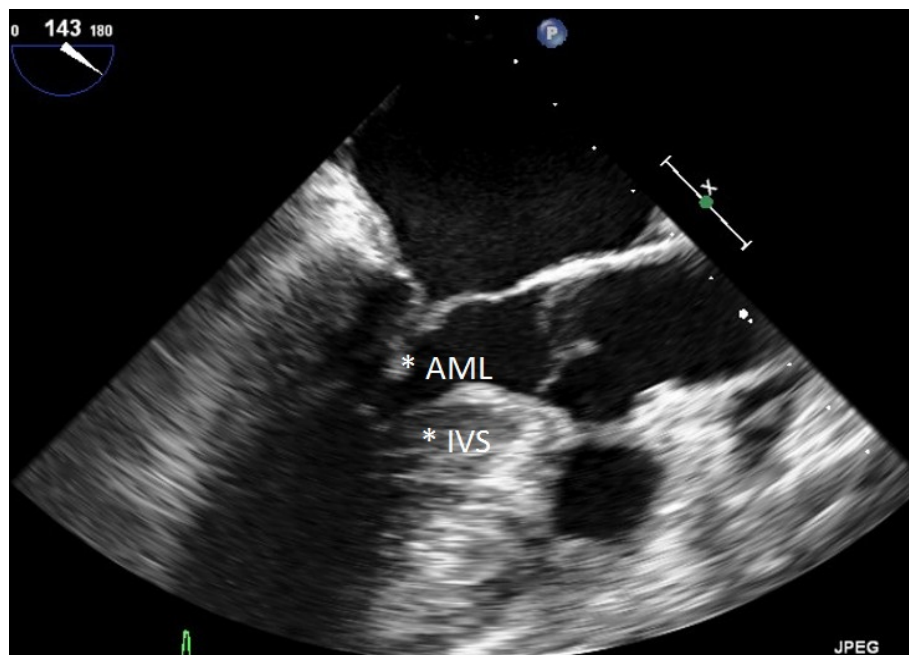
Obr. 1.11.

Jícnové echokardiografické vyšetření u pacientky s HCM s obstrukcí ve výtokovém traktu levé komory a mitrální regurgitací. Zobrazení v dvourozměrném módu a v barevném dopplerovském módu ukazuje trysku mitrální regurgitace orientovanou pod zadní cíp mitrální chlopně. AML - přední cíp mitrální chlopně, PML - zadní cíp mitrální chlopně, MiR - tryska mitrální regurgitace, LVOT - výtokový trakt levé komory.

znamená pro pacienty s HCM vyšší riziko vzniku fibrilace síní a tromboembolických komplikací. U části pacientů dochází vlivem diastolické dysfunkce levé komory i ke vzniku těžké postkapilární plicní hypertenze, která podle očekávání zhoršuje prognózu nemocných (Ong KC. et al., 2016).

Krevní zásobení myokardu je u pacientů s HCM zhoršené hypertrofií myokardu, zvýšeným diastolickým tlakem v levé komoře a mikrovaskulárním postižením koronárního řečiště. Další zhoršení koronární perfúze při koincidenci s ICHS zhoršuje pacientům s HCM jejich prognózu v porovnání s pacienty bez ICHS (Sorajja P. et al., 2003).

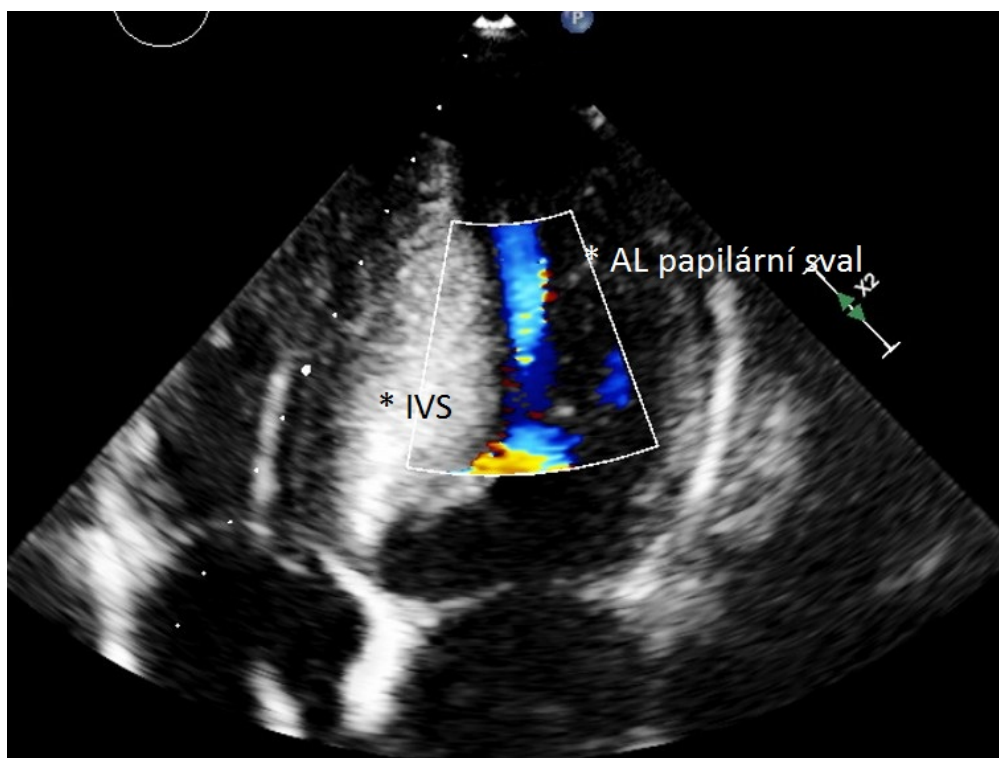
Důležitým hemodynamickým důsledkem HCM je přítomnost nitrokomorové obstrukce. U části pacientů dochází v dutině levé komory během systoly ke vzniku tlakového gradientu mezi dvěma částmi levé komory. Obstrukce vzniká nejčastěji ve výtokovém traktu levé komory srdeční, příčinou je kombinace hypertrofie bazální části interventrikulárního septa a prodloužení předního cípu mitrální chlopně, který (i díky abnormalitám ve svém závěsném aparátu) je krevním proudem vytékajícím z levé komory během systoly přiblížen k interventrikulárnímu septu (Obr. 1.12., Maron MS. et al., 2006). Méně často může



Obr. 1.12.

Jinové echokardiografické vyšetření u pacientky s HCM s obstrukcí ve výtokovém traktu levé komory. Je patrné přiblížení předního cípu mitrální chlopně a bazální části interventrikulárního septa během systoly, které tvoří podklad obstrukce ve výtokovém traktu levé komory. AML - přední cíp mitrální chlopně, IVS - interventrikulární septum.

nitrokomorová obstrukce vzniknout i na úrovni středních segmentů levé komory (midventrikulární obstrukce), kde se na ní podílejí hypertrofické papilární svaly (Obr. 1.13.),

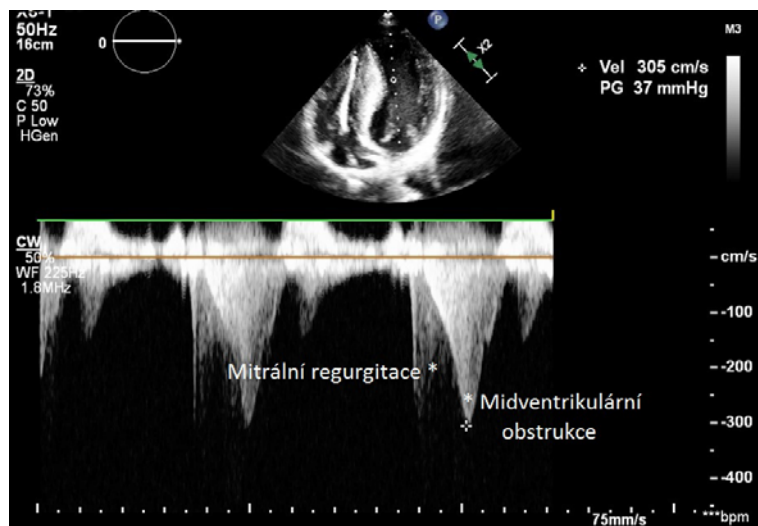


Obr. 1.13.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacienta s midventrikulární obstrukcí. Barevné dopplerovské zobrazení ve střední části levé komory zachycuje turbulentní tok v místě přiblížení výrazně hypertrofického interventrikulárního septa a anterolaterálního papilárního svalu. IVS - interventrikulární septum, AL - anterolaterální papilární sval.

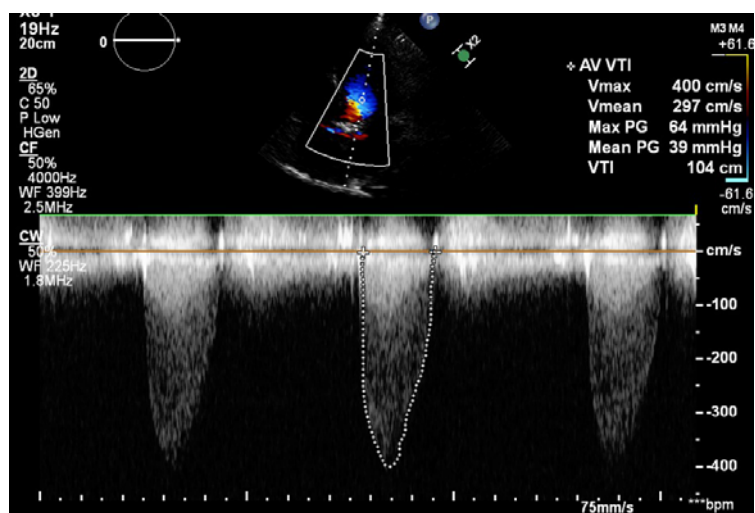
nebo v dutině pravé komory při vyklenutí hypertrofického interventrikulárního septa (Klues HG. et al., 1991). Nitrokomorová obstrukce u HCM je dynamickým jevem, její hodnota se mění v průběhu každé systoly i v důsledku aktuálních hemodynamických podmínek. Obstrukce se zhoršuje ke konci systoly (když se přední cíp mitrální chlopně blíží k interventrikulárnímu septu nebo se k sobě přibližují stěny levé komory a hypertrofické papilární svaly při midventrikulární obstrukci), proto má dopplerovské echokardiografické zobrazení tlakového gradientu u HCM typický tvar s maximální hodnotou v pozdní fázi

systoly (tvar dýky), na rozdíl od fixní obstrukce (jako například při aortální stenóze), kde je plocha stenotického ústí během celé systoly prakticky stejná (Obr. 1.14., 1.15.). Míra obstrukce se v čase mění i s hemodynamickými faktory ovlivňujícími náplň levé komory



Obr. 1.14.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacienta s midventrikulární obstrukcí, kontinuální dopplerovské zobrazení. Je patrný dobře vykreslený tlakový gradient s vrcholem v pozdní fázi systoly (tvar dýky), který má původ v midventrikulární obstrukci. Rovněž je patrný slabě vykreslený tlakový gradient během celé systoly, který je důsledkem malé mitrální regurgitace. Oba jevy se nacházejí v jedné linii snímané kontinuálním dopplerovským zobrazením v jiné hloubce zobrazených struktur.



Obr. 1.15.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacienta s aortální stenózou, kontinuální dopplerovské zobrazení. Je patrný tlakový gradient symetrického tvaru v důsledku fixní obstrukce při stenóze aortální chlopně.



(preload a afterload) a kontraktilitou myokardu.

Již zmíněná fibrilace síní je nejčastější arytmií u pacientů s HCM. Hlavními predisponujícími faktory pro vznik fibrilace síní jsou zvětšení levé síně a zvýšení tlaku v levé síni v důsledku diastolické dysfunkce, nitrokomorové obstrukce a mitrální regurgitace (Elliott P. et al., 2014). Kromě fibrilace síní, dochází u pacientů s HCM i ke vzniku nesetrválých i setrválých komorových tachykardií i fibrilace komor. Roli v jejich vzniku hraje pravděpodobně kromě jiného i intersticiální fibróza myokardu a mikrovaskulární postižení (Elliott P. et al., 2014).

### 1.7. Klinické důsledky

Většina pacientů s HCM nemá během svého života limitující symptomy, proto pravděpodobně zůstává část nositelů fenotypu nedignostikována (Elliott P. et al., 2014). Klinický význam onemocnění je dán rizikem náhlé srdeční smrti, morbiditou a mortalitou srdečního selhání a tromboembolickými komplikacemi fibrilace síní.

Náhlá smrt u pacientů s HCM vzniká zejména jako důsledek fibrilace komor (Nicod P. et al., 1988). HCM je významnou příčinou náhlé smrti u mladých dospělých, včetně vrcholových sportovců, podle některých studií jde o nejčastější příčinu náhlé smrti v těchto populacích (Maron BJ, Maron MS, 2013). U starších nemocných s HCM je náhlá smrt rovněž nezanedbatelnou příčinou mortality. Vzhledem k výrazně vyšší prevalenci ICHS (která je u starších dospělých nejčastější příčinou náhlé smrti) v této věkové skupině není jednoduché rozlišit jestli k náhlému úmrtí dochází v důsledku HCM nebo ICHS.

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 a zdá se, že přítomnost fibrilace síní u pacientů s HCM znamená vyšší riziko vzniku cévní mozkové příhody než u jiných onemocnění (Guttmann OP. et al., 2014). V posledních letech bylo publikováno několik prací zabývajících se dlouhodobým přežíváním nemocných s HCM (Ommen SR. et al., 2005, Sorajja P. et al., 2009, Nagueh SF. et al., 2011, Schaff HV. et al., 2012, Veselka J. et al., 2014, Veselka J. et al., 2016). Neselektované pacientské populace mají relativně dobrou prognózu, která je z pohledu rizika úmrtí porovnatelná s obecnou populací v daných zemích. Čím výraznější je ale vyjádření fenotypu

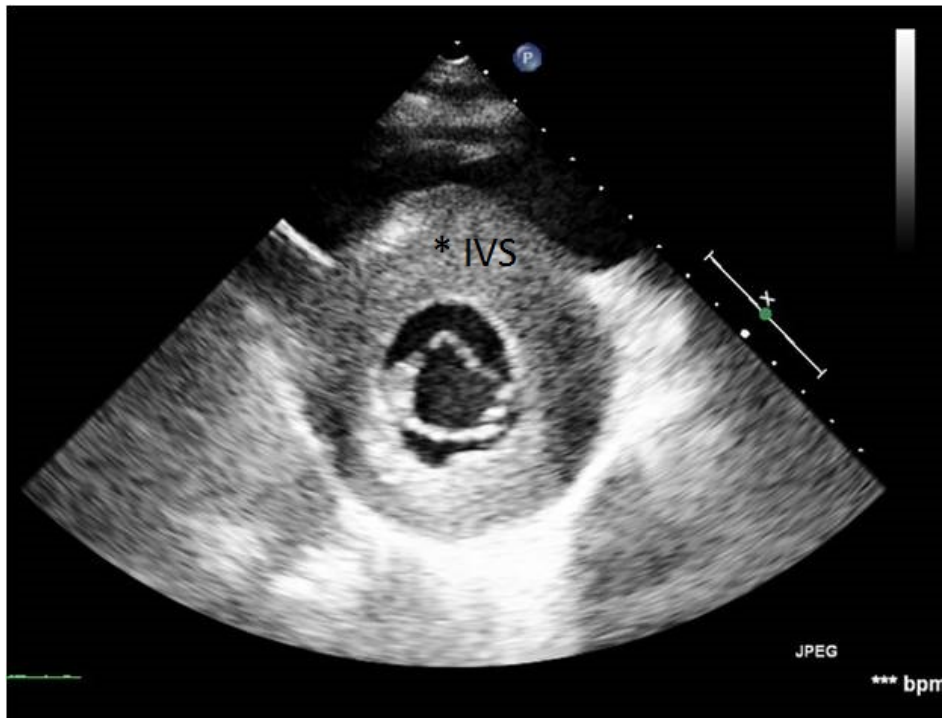
HCM, tím horší prognózu pacientů lze pozorovat. Mezi faktory, které byly asociovány s horší prognózou onemocnění, tak řadíme vyšší míru hypertrofie, těžký stupeň diastolické dysfunkce levé komory, systolickou dysfunkci levé komory, aneuryzma hrotové části levé komory, významnou nitrokomorovou obstrukci, postižení pravé komory nebo těžkou plicní hypertenzi. Samostatnou kapitolou je riziko náhlé srdeční smrti u HCM, které je rovněž asociováno s několika rizikovými faktory, kam patří rodinná anamnéza náhlé smrti, anamnéza nevysvětlené synkopy, maximální hypertrofie levé komory nad 30 mm, záchyt nesetrválých komorových tachykardií na ambulantním monitorování EKG a abnormální hemodynamická reakce na zátěž (Gersh BJ. et al., 2011). V posledních doporučených postupech ESC k diagnostice a léčbě HCM byl publikovaný nový skórovací systém predikující 5-leté riziko náhlé srdeční smrti, který nezahrnuje abnormální tlakovou reakci na zátěž, ale navíc obsahuje i věk pacienta, rozměr levé síně a hodnotu maximálního gradientu nitrokomorové obstrukce (Elliott. P. et al., 2014).

## 1.8. Diagnostika

Diagnóza HCM je založena na zobrazení hypertrofie levé komory nevysvětlitelné hemodynamickými podmínkami jakoukoliv zobrazovací metodou (Obr. 1.16., 1.17., Elliott P., et al., 2014). Nejčastěji je hypertrofie detekována echokardiografickým vyšetřením, lze ji ale prokázat i magnetickou rezonancí nebo počítačovou tomografií (CT) srdce (O’Hanlon R. et al., 2007). Doporučené postupy ESC stanovují jako diagnostické kritérium pro HCM u dospělých pacientů maximální tloušťku stěny levé komory alespoň 15 mm s vědomím, že fenotyp HCM může dosáhnout i menší míry hypertrofie, kdy je obtížné odlišení od nemocí se změněnými hemodynamickými podmínkami (arteriální hypertenze, chlopenní vady) a fyziologické hypertrofie při intenzivní fyzické zátěži (“sportovní” nebo “atletické” srdce Elliott. P. et al., 2014). V takové situaci je kromě zobrazení samotné hypertrofie k určení diagnózy potřeba dalších vyšetření.

### *Anamnéza a fyzikální vyšetření*

Jako u každého dědičného onemocnění hraje v diagnostice HCM roli rodinná anamnéza. Sestavení rodokmene pacienta s vyznačením příbuzných postižených onemocněním dokáže odhalit způsob dědičnosti v dané rodině a zpřesnit tak etiologii HCM. Nejčastější způsob přenosu u HCM je autozomálně dominantní, kterým se přenáší mutace v genech pro sarkomerické proteiny i vrozené syndromy. Postižené jedince u něj nalzáme v každé

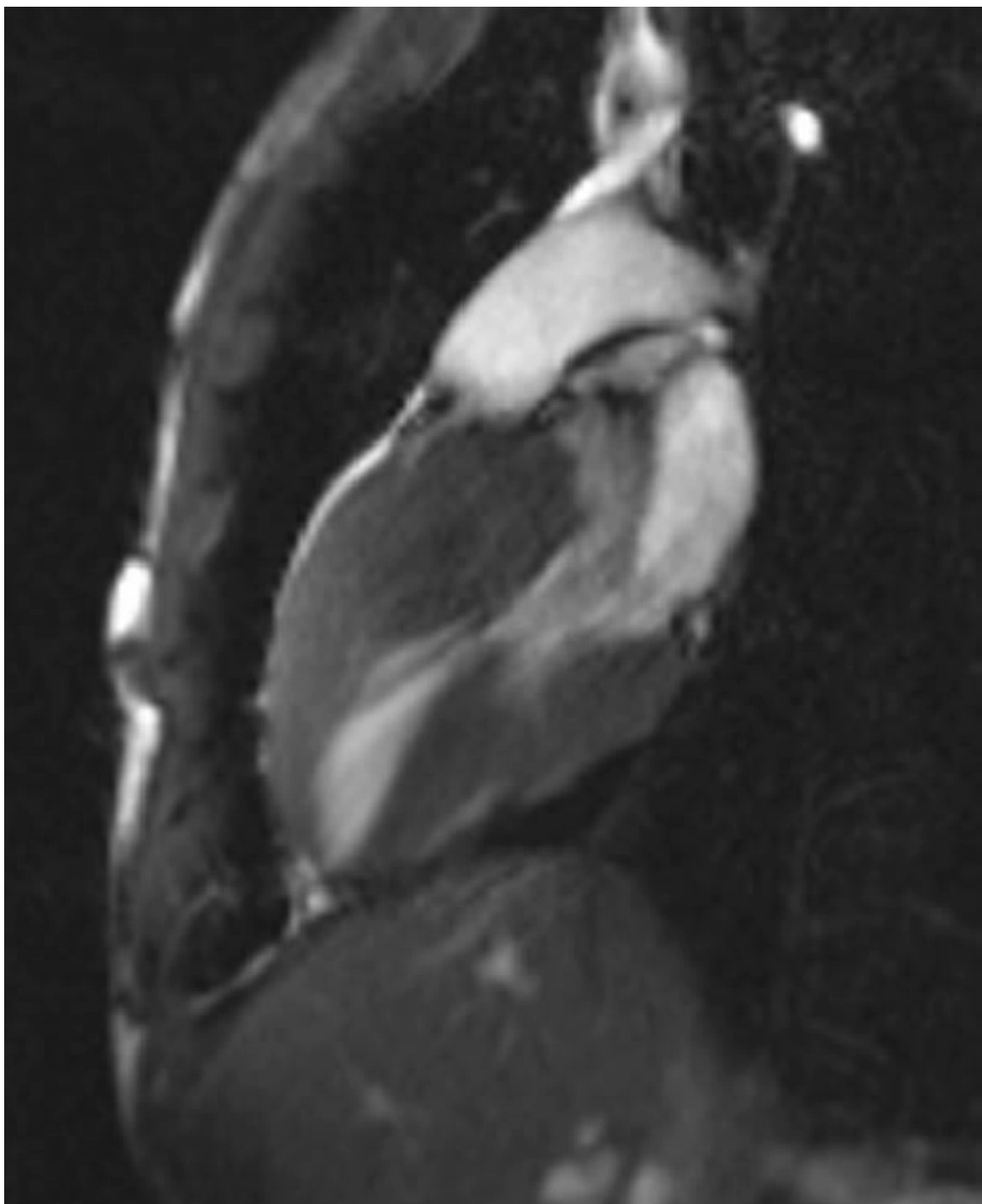


Obr. 1. 16.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na krátkou osu v úrovni mitrální chlopně u pacienta s HCM. Je patrná koncentrická hypertrofie levé komory. IVS - interventrikulární septum

generací, přenos je možný od rodičů obou pohlaví a riziko přenosu znaku na potomka je 50 %. Autozomálně recesivní přenos nalzáme u metabolických onemocnění, Friedreichovy ataxie a některých mitochondriopatií. V rodokmenu se může projevit nepřítomností nemoci ani u jednoho z rodičů probanda. Gonozomální přenos (u Andersonovy-Fabryho a Danonovy nemoci) se projevuje izolovaným nebo výraznějším postižením mužů a absence přenosu z otce na syna. Zaznamenání výskytu náhlé smrti v rodině je důležité pro určení rizika náhlého úmrtí probanda.

Typickými symptomy pacientů jsou únavnost a dušnost jako projevy srdečního selhání, které může být způsobeno diastolickou nebo systolickou dysfunkcí levé komory, nitrokomorovou obstrukcí či mitrální regurgitací (Elliott P. et al., 2014). Selhání z kterékoliv z těchto příčin dokáže zhoršit nově vzniklá fibrilace síní s rychlou odpovědí komor, což je i nejčastější důvod akutní dekompenzace srdečního selhání u pacientů s HCM. Dalším častým symptomem jsou anginózní bolesti na hrudi, které jsou způsobeny ischemií myokardu při hypertrofii, mikrovaskulární dysfunkci, zvýšeném napětí stěny levé komory (wall stress) při



Obr. 1.17.

Magnetická rezonance srdce u pacienta s HCM. Je patrná hypertrofie levé komory s maximálním vyjádřením v bazálním segmentu přední stěny.

nitrokomorové obstrukci a případnou koincidencí ICHS.

Palpitace jsou nespecifickým příznakem, který může doprovázet komorové extrasystoly i setrvalé supraventrikulární či komorové arytmie. Synkopa má i u pacientů s HCM širokou diferenciální diagnostiku, specifickou etiologii představuje nitrokomorová obstrukce a komorové tachykardie. U pacientů s HCM je nevysvětlená synkopa rizikovým faktorem náhlé srdeční smrti. Nekardiální symptomy u pacientů s fenotypem HCM mohou poukazovat na specifickou etiologii při metabolických vadách, vrozených syndromech, neuromuskulárních a střádavých onemocněních či mitochondriopatiích (McCully RB. et al., 1996, Prasad K. et al., 2008).

Fyzikální vyšetření je u HCM často bez pozoruhodných nálezů, v případě pokročilého srdečního selhání může být přítomna tachykardie, třetí srdeční ozva, poslechový nález na plicích, zvýšená náplň krčních žil či periferní otoky. Fibrilace síní se projeví jako nepravidelně nepravidelná srdeční akce s možným periferním deficitem při palpaci pulzu. Typickým poslechovým nálezem nitrokomorové obstrukce je systolický šelest s poslechovým maximem u levého okraje sternu. Intenzita šelestu stejně jako velikost nitrokomorového tlakového gradientu stoupá při manévrech snižujících preload a afterload levé komory srdeční (postavení ze dřepu, Valsalvův manévr). Systolický šelest nad srdečním hrotem s propagací do axily je patrný u mitrální insuficience. I fyzikální vyšetření může poukázat na nekardiální postižení u metabolických vad, vrozených syndromech a neuromuskulárních onemocnění.

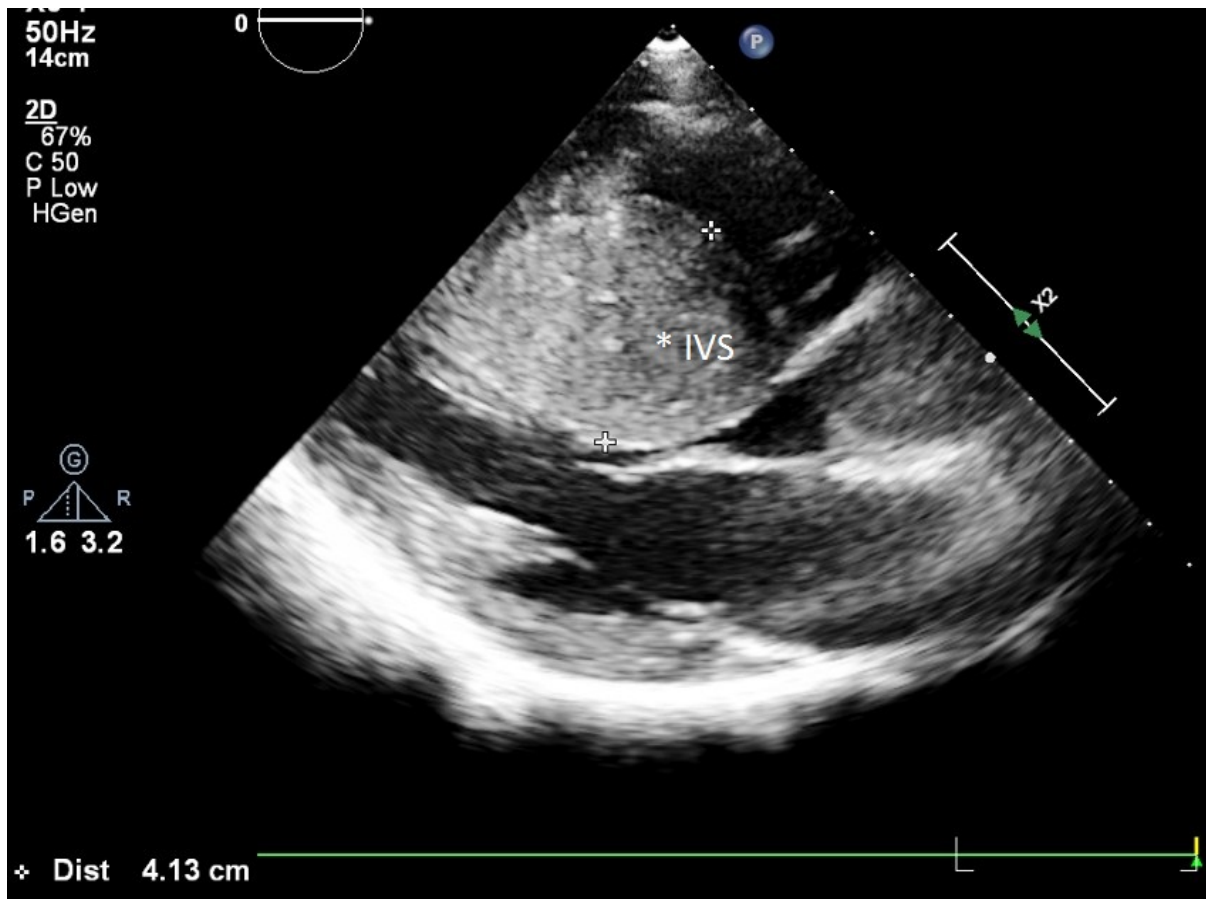
### *Elektrokardiografie*

Elektrokardiografie (EKG) u pacientů s HCM často vykazuje různé abnormality. Typickým znakem na 12-ti svodovém EKG je přítomnost kritérií hypertrofie levé komory, extrémní hodnoty jsou pozorovatelné zejména u metabolických vad (Pompeho a Danonova nemoc), naopak nízká voltáž QRS komplexu navzdory hypertrofii může být známkou srdeční amyloidózy. Mezi další nálezy na EKG patří Q kmita a abnormality ST úseku a T vlny i při absenci ICHS (McLeod CJ. et al., 2009). Distribuce Q kmitů abnormálního trvání (nad 40 ms) koreluje s lokalizací fibrózy v levé komoře, elevace ST segmentů v laterálních svodech někdy doprovází apikální aneurysma a hluboce negativní T vlny v prekordiálních svodech bývají patrné u apikální formy HCM. Zkrácení PQ intervalu s preexcitací může ukazovat na metabolické vady (Pompeho a Danonova nemoc, mutace v genu *PRKAG2*) a mitochondriopatie, samotné zkrácení PQ intervalu poté na Andersonovu-Fabryho nemoc. Vznik AV bloku můžeme pozorovat u metabolických onemocnění i amyloidózy (Rapezzi C. et al., 2013). Ambulantní monitorování EKG se u pacientů s HCM využívá ke stratifikaci

rizika náhlé srdeční smrti. Během 24 - 48 hodinového monitorování má 25 % pacientů zachycenu nesetrvanou komorovou tachykardií definovanou jako alespoň tři po sobě následující komorové stahy s frekvencí nad 120/min. Až 40 % pacientů má při ambulantním monitorování přítomno paroxysmy supraventrikulární tachykardie, které představují riziko embolizačních příhod (Adabag AS. et al., 2005).

### *Echokardiografie*

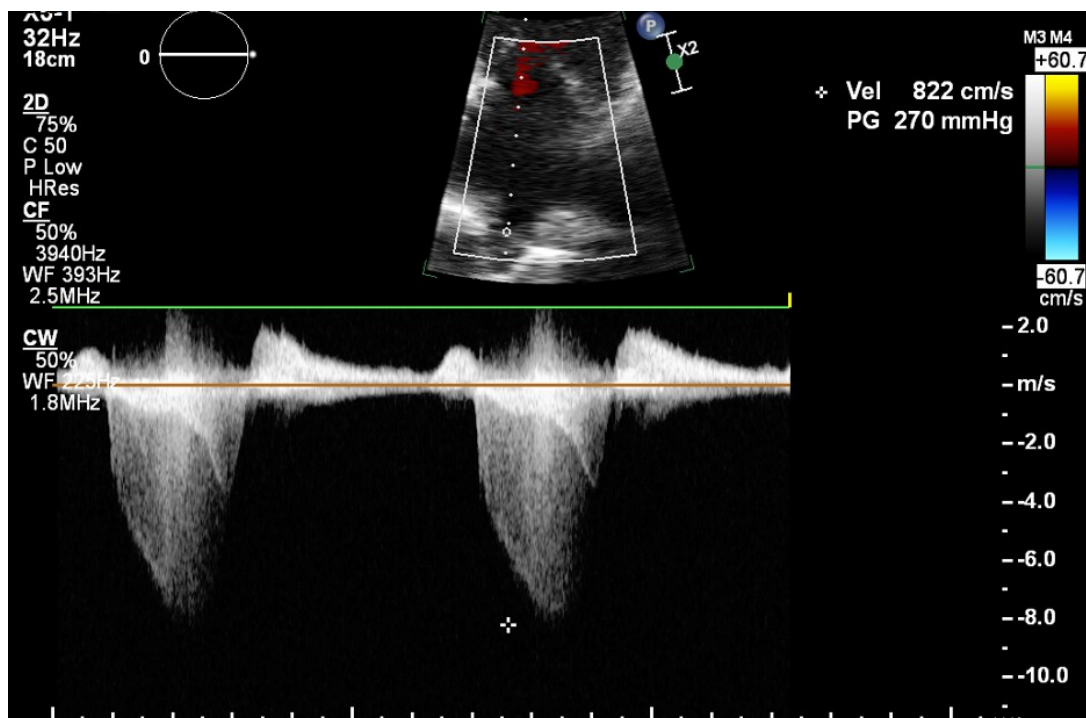
Echokardiografické vyšetření hraje stěžejní roli ve stanovení diagnózy HCM i v dlouhodobém sledování pacientů s HCM. Měřením tloušťky srdeční stěny ve standardních projekcích se zobrazí hypertrofie levé komory jako základní znak fenotypu HCM (Obr. 1.18.). Při omezené



Obr. 1.18.

Transthorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu. Je patrně výrazně hypertrofické interventrikulární septum s tloušťkou 41 mm. IVS - interventrikulární septum.

echokardiografické vyšetřitelnosti a v situaci, kdy k hypertrofii dochází pouze v jednom nebo několika málo segmentech levé komory, dokáže přesnost vyšetření zvýšit použití kontrastní echokardiografie, případně je k zobrazení hypertrofie vhodné použít magnetickou rezonanci. Echokardiografie je klíčová k zachycení nitrokomorové obstrukce. Dokáže zobrazit struktury podílející se na vzniku obstrukce, jako je hypertrofické bazální interventrikulární septum, přední cíp mitrální chlopně a jeho dopředný pohyb během systoly a hypertrofické papilární svaly v případě midventrikulární obstrukce. Dopplerovské vyšetření přesně kvantifikuje velikost tlakového gradientu vlivem obstrukce. Obstrukce se považuje za přítomnou při maximálním tlakovém gradientu nad 30 mm Hg, s narůstajícím tlakovým gradientem pak progresivně narůstá impedance toku krve (Wigle ED. et al., 1985). Přibližně třetina pacientů s HCM má již v klidu přítomnou nitrokomorovou obstrukci, další třetina má latentní obstrukci, která není přítomna v klidu, ale projeví se při manévrech nebo farmakologických provokacích, které snižují preload a afterload anebo zvyšují kontraktilitu levé komory (Obr. 1.19.). Nejcitlivější metodou k detekci obstrukce je fyzická zátěž a zátěžová echokardiografie, která je ale rovněž

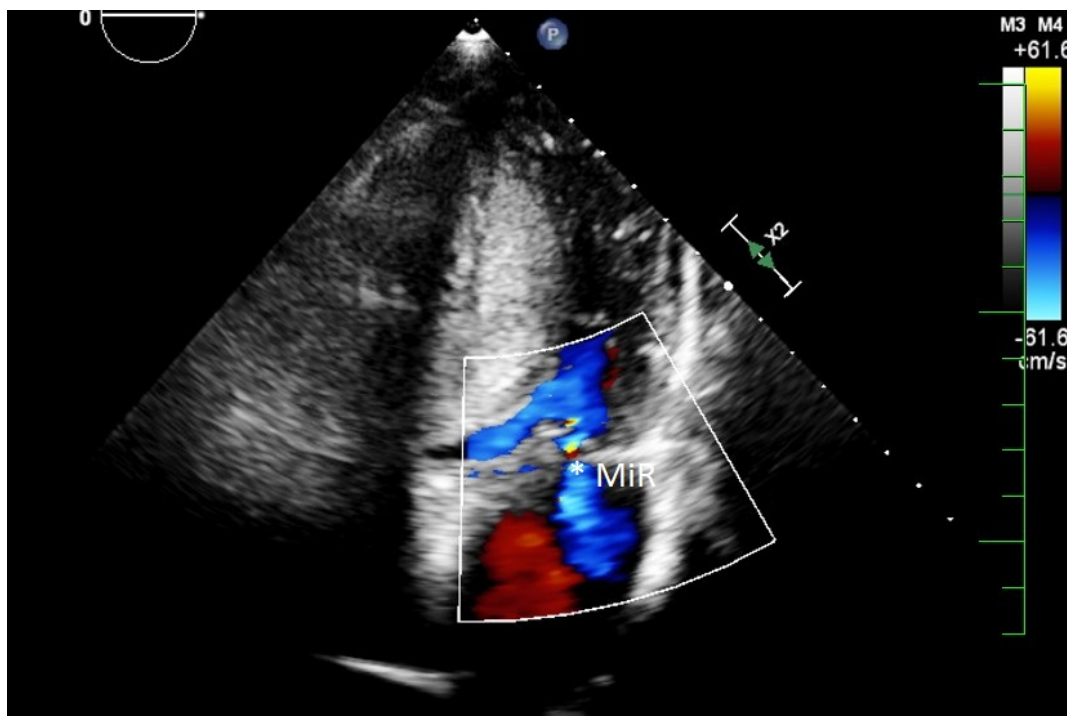


Obr. 1.19.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacientky s obstrukcí ve výtokovém traktu levé komory, kontinuální dopplerovské zobrazení. Je patrný

výrazný tlakový gradient (270 mm Hg) s vrcholem v pozdní fázi systoly (tvar dýky) po provokaci Valsalvovým manévrem.

časově obstrukce je fyzická zátěž a zátěžová echokardiografie, která je ale rovněž časově nejnáročnější. V klinické praxi je přínosná k rozhodnutí o další léčbě zejména u symptomatických pacientů, kterým se nepodařilo dokumentovat přítomnost obstrukce jinými testy (Dimitrow PP. et al., 2009). Nejpoužívanějším provokačním manévrem je Valsalvův manévr, farmakologická provokace nitráty méně reprodukuje výsledky fyzické zátěže a použití dobutaminu není fyziologickým provokačním mechanismem. Přítomnost nitrokomorové obstrukce je rovněž rizikovým faktorem náhlé srdeční smrti i prediktorem horší prognózy nemocných (Maron MS. et al., 2003, Veselka J. et al., 2016). Mitrální insuficience je častým nálezem u HCM, který je rovněž zobrazitelný echokardiografií. Při dopředném systolickém pohybu předního cípu mitrální chlopně dochází prakticky vždy k poruše koaptace cípů a alespoň malé mitrální regurgitaci, která směřuje pod zadní cíp (Obr. 1.20.). Centrální nebo dopředu orientovaná mitrální regurgitace většinou

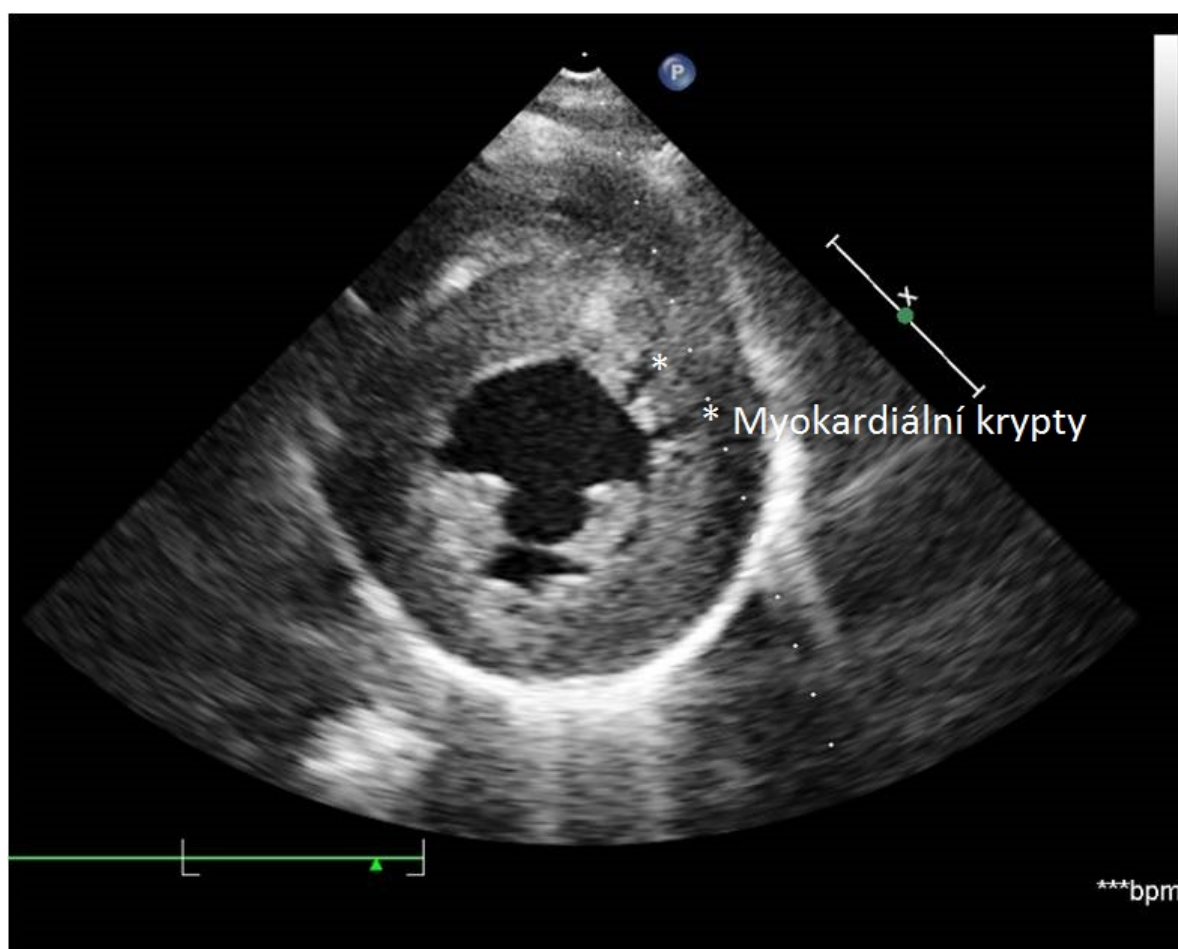


Obr. 1.20.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacienta s HCM, barevné dopplerovské zobrazení. Je patrná tryska malé mitrální regurgitace orientované pod zadní cíp mitrální chlopně. MiR - tryska mitrální regurgitace.



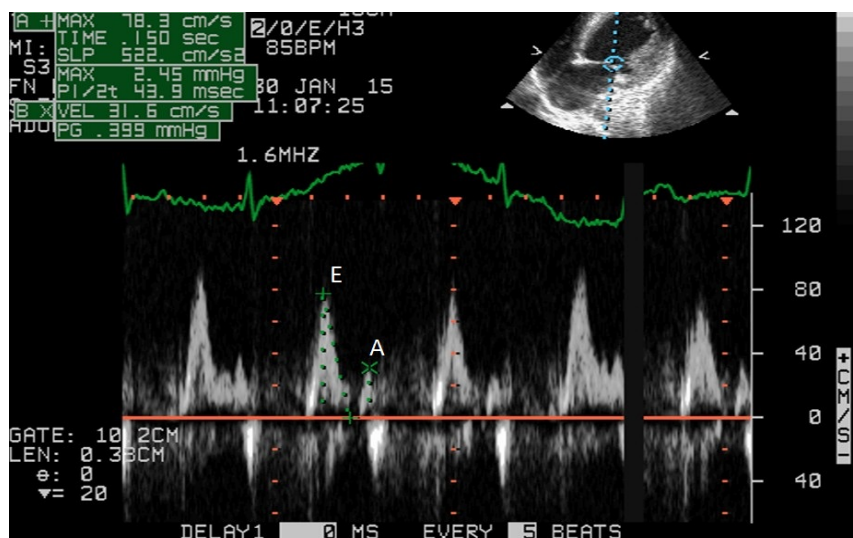
doprovází primární mitrální vadu, která nevyimí po léčbě nitrokomorové obstrukce. Levá síň je u pacientů s HCM často zvětšena v důsledku mitrální regurgitace a zvýšených plicních tlaků levé komory. Rozměr levé síně je součástí nového modelu predikce rizika náhlé smrti dle doporučených postupů ESC (Elliott, P. et al., 2014). Zvláštním morfoloogickým nálezem u HCM s nejasným klinickým významem jsou myokardiální krypty, invaginace dutiny levé komory do hypertrofického myokardu, zachytitelné zejména magnetickou rezonancí, vzácně i echokardiografií (Obr. 1.21., Spacek M. et al., 2014).



Obr. 1.21.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na krátkou osu v úrovni papilárních svalů u pacienta s HCM. Na boční stěně jsou zobrazeny dvě myokardiální krypty.

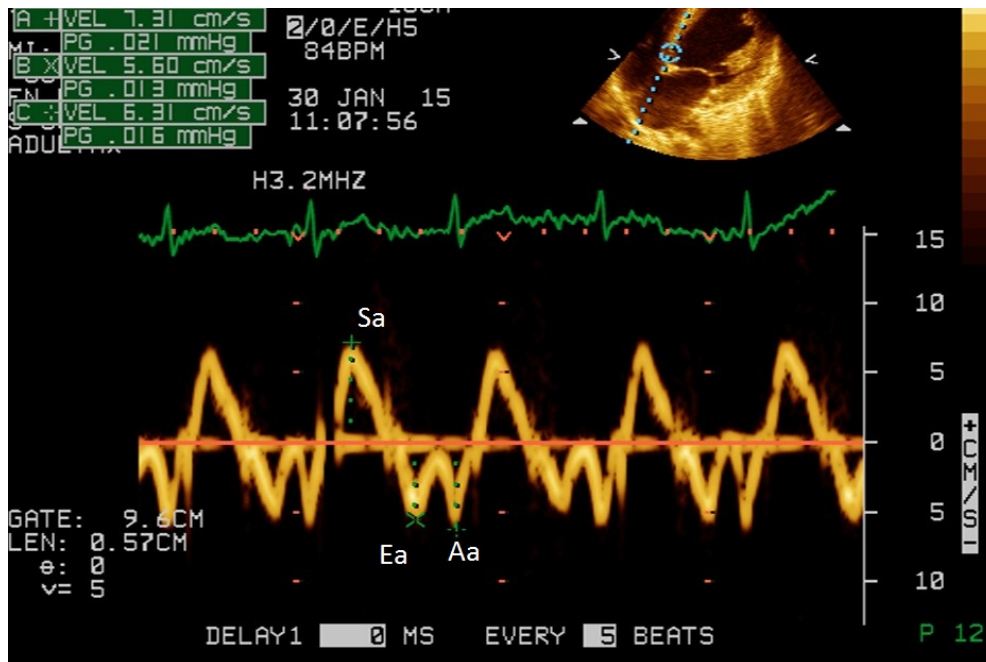
Komplexní zhodnocení diastolické funkce je součástí echokardiografického vyšetření u pacientů s HCM. Diastolická dysfunkce levé komory je důležitou příčinou klinických projevů srdečního selhání a pacienti s restričním typem plnění levé komory (nejtěžším stupněm diastolické dysfunkce) mají horší prognózu (Kitaoka H. et al., 2011). Žádný z echokardiografických parametrů dokonale nevystihuje poruchu diastolické funkce, k jejímu zhodnocení se používá kombinace parametrů dopplerovského měření průtoku mitrální chlopní, dopplerovského měření rychlosti pohybu mitrálního prstence, průtok plicními žilami a velikost levé síně (Obr. 1.22., 1.23.). I když globální ukazatele systolické funkce levé



Obr. 1.22.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacientky s HCM, pulzní dopplerovské zobrazení na úrovni mitrální chlopně. Průtok mitrální chlopní vykazuje parametry restričního typu plnění levé komory jako nejtěžšího stupně diastolické dysfunkce levé komory. Poměr maximálních rychlostí časného a pozdního diastolického průtoku (E/A) je nad 2, decelerační čas vlny E je 150 ms. E - časný diastolický průtok mitrální chlopní, A - pozdní diastolický průtok mitrální chlopní.

komory jako je ejekční frakce dosahují u většiny pacientů normální nebo vyšší než normální hodnoty, již zmíněné další parametry systolické funkce jako deformační ukazatele (strain a strain rate) a rychlosti longitudinálního pohybu myokardu mohou být sníženy zejména v segmentech postižených hypertrofií (Urbano-Moral JA. et al., 2014). Na specifickou etiologii HCM lze usuzovat podle některých echokardiografických ukazatelů. Koncentrická hypertrofie je častější u metabolických onemocnění, extrémní hypertrofie doprovází zejména Danonovu a Pompeho nemoc. Ztluštění interatriálního septa a cípů atrioventrikulárních chlopní a



Obr. 1.23.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacientky s HCM, tkáňové dopplerovské zobrazení septálního okraje mitrálního anulu. Nižší maximální časná diastolická rychlost pohybu mitrálního anulu oproti pozdní diastolické rychlosti a celkově snížené maximální rychlosti pohybů ukazují na diastolickou dysfunkci levé komory. Ea - časná diastolická rychlost pohybu mitrálního anulu, A - pozdní diastolická rychlost pohybu mitrálního anulu, Sa - systolická rychlost pohybu mitrálního anulu.

restriktivní plnění levé komory s malým perikardiálním výpotkem patří do obrazu srdeční amyloidózy. Hypertrofie pravé komory a obstrukce v jejím výtokovém traktu bývá součástí syndromu Noonanové. Jícnová echokardiografie je využívána u pacientů s omezenou transtorakální vyšetřitelností, k posouzení mechanismu obstrukce ve výtokovém traktu levé komory, kvantifikaci vad mitrální chlopně a při myektomii k perioperační monitoraci výkonu a detekci komplikací.

### *Magnetická rezonance*

Magnetická rezonance srdce je důležitou diagnostickou metodou u pacientů s HCM. Pro zhodnocení morfologie a funkce levé komory srdeční poskytuje podobné informace jako echokardiografie u dobře vyšetřitelných pacientů, ale u části nemocných je přesnější v zobrazení některých oblastí a struktur jako jsou srdeční hrot, anterolaterální oblast levé komory nebo pravá komora, kde dokáže lépe kvantifikovat hypertrofii myokardu. Lepší

zobrazení poskytuje magnetická rezonance i v případě anomálií a hypertrofie papilárních svalů, při detekci myokardiálních krypt a apikálních aneuryzmat levé komory (Rickers C. et al., 2005). Magnetická rezonance dokáže kvantifikovat nitrokomorovou obstrukci i diastolické průtoky mitrálním ústím a průtok plicními žilami, ale tato vyšetření jsou časově náročná a obstrukce se kvantifikuje za klidových podmínek, proto je metodou volby ke zhodnocení nitrokomorové obstrukce i diastolické funkce levé komory echokardiografie. Využitím rozdílných magnetických vlastností jednotlivých tkání a zobrazením distribuce gadoliniové kontrastní látky lze pomocí magnetické rezonance detekovat intersticiální fibrózu myokardu (Obr. 1.24.). Ta je přítomna u přibližně 65 % pacientů s HCM a je lokalizována



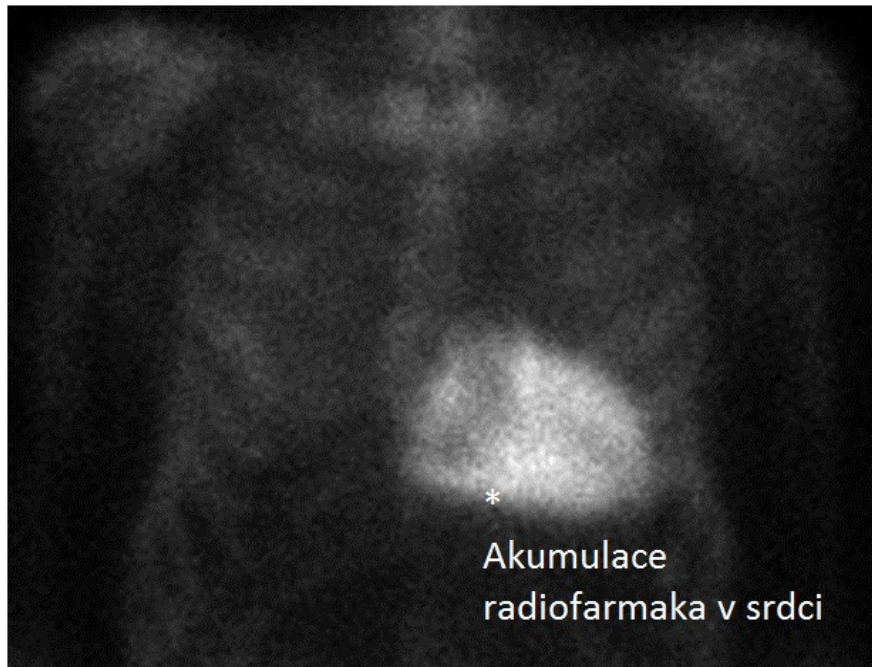
Obr. 1.24.

Magnetická rezonance srdce u pacienta s HCM. Bílou barvou je zobrazeno pozdní sycení gadolínem v oblasti hrotu a apikální části přední stěny levé komory. LGE - pozdní sycení gadolínem.

zejména v hypertrofických segmentech a v bodech inzerce myokardu pravé komory do interventrikulárního septa. Její distribuce je odlišná od distribuce fibrózy po infarktu myokardu, nejčastěji tvoří nepravidelná ložiska uložená uprostřed srdeční svaloviny. K transmuralní fibróze a ztenčení stěny dochází u části pacientů při rozvoji systolické dysfunkce (end-stage disease) a apikálních aneuryzmat (Rudolph A. et al., 2009). Přítomnost fibrózy při vyšetření magnetickou rezonancí je asociována s výskytem nesetrválých komorových tachykardií při ambulantním monitorování EKG a rovněž s vyšším rizikem kardiovaskulárních příhod, včetně srdečního selhání a kardiovaskulární i celkové mortality. Metaanalýza publikovaných dat ale ukazuje pouze trend asociace fibrózy s rizikem náhlé smrti (Green JJ. et al., 2011).

#### *Další vyšetřovací metody*

Z metod nukleární medicíny se v diagnostice HCM využívá afinita transtyretinu (TTR) k radiofarmakům používaných při kostních scintigrafiích (nejvíce technecium-difosfopropano-dikarboxylová kyselina, Tc-DPD), která se využívá při podezření na TTR amyloidózu (tedy hereditární a senilní, Obr. 1.25.). K akumulaci radiofarmaka v srdci



Obr. 1.25.

SPECT s využitím Tc-DPD u pacienta se senilní amyloidózou srdce. Je patrná akumulace radiofarmaka v myokardu, která převyšuje jeho akumulaci ve skeletu.

nedochází při sarkomerické HCM ani HCM jiných etiologií (Rapezzi C. et al., 2011).

Vyšetření srdce počítačovou tomografií (CT) dokáže za cenu ionizujícího záření poskytnout analogické informace o struktuře a funkci srdečních oddílů jako echokardiografické vyšetření a magnetická rezonance. Navíc podává i informaci o případném postižení věnčitých tepen u ICHS. V případě HCM je CT vyšetření rezervováno pro pacienty s limitovanou echokardiografickou vyšetřitelností a kontraindikacemi magnetické rezonance (Elliott P. et al., 2014).

Endomyokardiální biopsie není potřebná ke stanovení diagnózy HCM, která je dosažitelná klinickým vyšetřením a neinvazivními metodami, ale její použití je možné při diagnostice infiltrativních a strádavých onemocnění s fenotypem HCM.

### *Genetické vyšetření*

HCM se nejčastěji dědí jako autozomálně dominantní znak s typickým familiárním výskytem a 50% rizikem přenosu na potomky. Část případů je sporadických při de novo vzniklých mutacích, případně tak působí v momentu stanovení diagnózy u probanda při neúplné penetranci u postiženého rodiče nebo autozomálně recesivním typu přenosu u některých forem HCM. K rozlišení typu přenosu je důležité získání rodinné anamnézy a sestavení rodokmenu. Genetické poradenství je součástí péče o pacienty s HCM a jejich příbuzné s cílem informovat nemocné o riziku přenosu a prognózách rozvoje onemocnění, jeho klinických důsledcích a možnostech genetického vyšetření (Elliott P. et al., 2014).

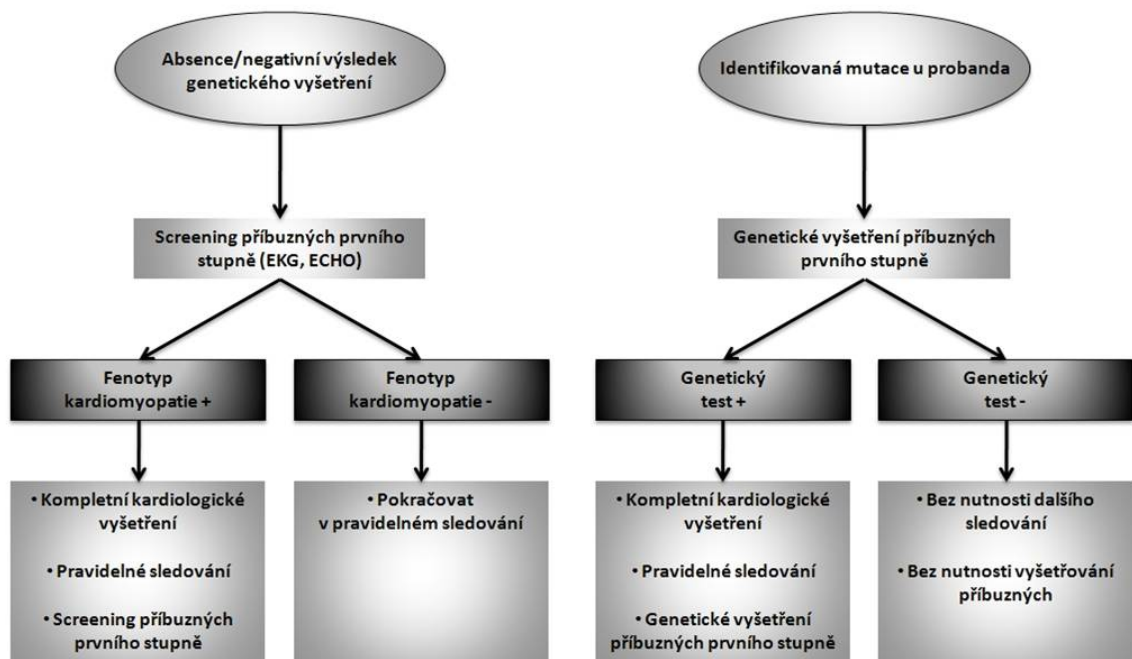
Tradiční způsob genetického vyšetření pacientů s HCM zahrnoval vyšetření sarkomerických genů pomocí přímého sekvenování, moderní alternativou je vysokokapacitní vyšetření většího množství genů (vždy však obsahující i sarkomerické geny) pomocí metod sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS). Faktory omezující aktuální klinický přínos genetického vyšetření jsou genetická variabilita onemocnění, nález genetických variant nejasného významu a omezená korelace genotypu a fenotypu a tím minimální ovlivnění klinické péče o pacienty. Pouze u 50-60 % pacientů identifikujeme mutaci v genech pro sarkomerické proteiny (Charron P. et al., 2010, Gersh BJ. et al., 2011). Negativní výsledek genetického vyšetření tedy neznamená jistotu nepřítomnosti onemocnění a omezuje jeho použití ve vyloučení HCM jako příčiny nálezu hraniční hypertrofie levé komory (u pacientů s arteriální hypertenzí nebo u sportovců s fyziologickou adaptací). Nález mutace je častější u mladších pacientů a u pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou HCM a i u pacientů s výraznější hypertrofií myokardu (Gersh BJ. et al., 2011). Morfologie levé komory je rovněž asociována se záchytem příčinné mutace. Nejčastější je u pacientů s reverzní morfologií

interventrikulárního septa (septum konvexně vyklenuté do dutiny levé komory), kde dosahuje až 80 %. Naopak nejnižší záchyt mutace je u starších pacientů se septum sigmoideum (konkávní plocha směrem do dutiny levé komory), kde tvoří pouhých 10 % (Binder J. et al., 2006). Tito pacienti, splňující klinickou definici HCM, tedy ve většině případů nemají z genetického pohledu sarkomerickou HCM a není zcela jasné, jestli u nich jde o dědičné onemocnění nebo změny morfologie levé komory srdeční vlivem věku. Skupinu pacientů bez identifikované mutace v sarkomerických genech tedy mohou tvořit jedinci s nedědičnou etiologií hypertrofie levé komory a z menší části jedinci s jinými genetickými nemocemi vedoucími k fenotypu HCM (viz etiologie, metabolická onemocnění, vrozené syndromy, mitochondriální kardiomyopatie, neuromuskulární a infiltrativní onemocnění). Část pacientů může být nositeli mutace v genech doposud neasociovaných s HCM, i mimo oblast sarkomery. Při vzájemné genetické provázanosti jednotlivých familiárních forem kardiomyopatií lze očekávat, že mutace v genech asociovaných s ostatními kardiomyopatiemi mohou při odlišném efektu na funkci proteinu vést k rozvoji fenotypu HCM. Metody NGS umožňují efektivní a rychlou analýzu velkého množství genů nebo celého genomu. Vyšetření více genů ale nevyhnutelně přináší identifikaci více vzácných genetických variant. Je potřebné co nejpřesněji odlišit mutaci s kauzálním vztahem ke vzniku onemocnění od ostatních vzácných genetických variant, které nejsou patogenní. Základem této stratifikace je klasifikace identifikovaných variant na základě všech dostupných důkazů o jejich kauzalitě (pozitivních i negativních), jako jsou vzácnost výskytu, výskyt v kontrolních populacích, kosegregace s fenotypem, postižení konzervovaného místa, predikce dopadu na funkci proteinu a výsledky buněčných a zvířecích modelů (MacArthur DG. et al., 2014). Mnoho z identifikovaných variant postrádá přesvědčivé důkazy o roli v patogenezi HCM, označujeme je jako varianty nejasného významu. 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). Klinický průběh onemocnění je totiž velmi variabilní i v rámci jedné rodiny (u nositelů identických mutací). Jedním z cílů péče o pacienty s HCM je co nejpřesněji identifikovat jedince ohrožené náhlou srdeční smrtí, u kterých se indikuje preventivní léčba v podobě implantabilních kardioverterů-defibrilátorů. Tato léčba je ovšem invazivní a zatížena jistým rizikem komplikací a je navíc ekonomicky nákladná. V současnosti se indikace řídí stanovením rizika podle přítomnosti jednotlivých rizikových faktorů z anamnézy a zobrazovacích metod (Gersh BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). Tyto stratifikační systémy mají ale jenom omezenou schopnost správně určit jedince

ohrožené náhlou smrtí (Jahnlova D. et al., 2015). Prokázání asociace konkrétních mutací s rizikem náhlé smrti by vedlo k přesnějším indikacím léčby, zatím se ale použitelný vztah mutace s rizikem závažných arytmií nepovedlo identifikovat. Mutace v genech pro srdeční troponiny a některé mutace v genu pro těžký řetězec  $\beta$  myozinu byly v minulosti na základě kauzistických sdělení označeny za rizikové a mutace v genu pro myozin vazebný protein naopak za benigní stran náhlé srdeční smrti, neexistují ale přesvědčivé důkazy o vlivu konkrétních mutací na vznik náhlé srdeční smrti (Watkins H. et al., 1995, Moolman JC. et al., 1997, Pasquale F. et al., 2012). Je ale logické předpokládat, že typ mutace má dopad na klinickou prognózu pacienta. Porovnání skupin pacientů s mutací v genech pro tenká a tlustá filamenta (dva nejčastěji zastoupené geny pro těžký řetězec  $\beta$  myozinu a pro myozin vazebný protein C patří mezi tlustá filamenta) v nedávné práci ukázalo vyšší pravděpodobnost vývoje systolické dysfunkce i těžké diastolické dysfunkce u pacientů s mutacemi v genech pro tenká filamenta. Naproti tomu arytmiické příhody včetně náhlé smrti nebyly u pacientů s postižením tenkých filament (kam patří i srdeční troponiny) častější (Coppini R. et al., 2014).

Hlavní klinický význam genetického vyšetření HCM je identifikace specifické etiologie u pacientů se speciálními rysy fenotypu a případně specifickou terapií (jako jsou metabolická onemocnění) a zejména genetická diagnostika příbuzných (Charron P. et al., 2010). Vzhledem k monogenní dědičnosti HCM a jejímu klinickému významu jsou příbuzní pacientů indikováni ke screeningovému vyšetření s cílem identifikace fenotypu. Základem tohoto vyšetření je stejně jako při stanovení diagnózy onemocnění u probanda identifikace hemodynamicky nevysvětlené hypertrofie levé komory srdeční pomocí zobrazovacích metod. Příbuzní podstupují klinické vyšetření kardiologem, EKG a echokardiografické vyšetření, případně magnetickou rezonanci. V případě identifikace fenotypu se provádí další vyšetření zejména ke stratifikaci rizika náhlé smrti a screeningové vyšetření příbuzných těchto jedinců. Limitujícím faktorem klinického kaskádového screeningu je na věku závislá penetrance onemocnění. Při absenci fenotypu u příbuzného si nemůžeme být jisti, že není nositelem patogenní mutace a není ohrožen rozvojem fenotypu a klinickými důsledky onemocnění v pozdějším věku. Klinická vyšetření, EKG a echokardiografii je proto potřeba opakovat v pravidelných intervalech i u asymptomatických příbuzných až do věku 50-60 let. Interval opakovaných vyšetření je mezi 2-5 lety podle věku příbuzných, klinické závažnosti projevu onemocnění v rodině, případně participace příbuzného ve vrcholových sportech. Nález patogenní mutace u probanda umožní přesnou genetickou diagnostiku na přítomnost dané mutace u jeho příbuzných a dokáže identifikovat jedince ohrožené HCM i v době před





Obr. 1.26.

Model sledování příbuzných pacientů s familiárními kardiomyopatiemi dle stanoviska ESC v případě pozitivního a negativního výsledku genetického vyšetření (Charron P. et al., 2010).

rozvojem detekovatelného fenotypu. U příbuzných, kteří jsou nositeli patogenní mutace, je možné dále geneticky vyšetřit jejich příbuzné prvního stupně (Obr. 1.26., kaskádový genetický screening, Charron P. et al., 2010). Existuje málo dat o dlouhodobém sledování nositelů mutace bez vyvinutého fenotypu HCM a není jasné jaké je jejich riziko rozvoje klinických příhod, považuje se ale za malé. Vznik náhlé smrti před rozvojem hypertrofie levé komory je vzácný a zmínky o ní se týkají zejména několika izolovaných sdělení při identifikovaných mutacích v genu pro srdeční troponin T (Moolman JC. et al., 1997, Pasquale F. et al., 2012). V průřezových studiích podle očekávání stoupá s věkem i podíl nositelů mutace s rozvinutým fenotypem, lze tedy očekávat, že část příbuzných s patogenní mutací rozvine během svého života obraz HCM a je logické přistupovat k nim jako k pacientům s HCM, včetně potřeby dlouhodobého sledování a stratifikace rizika náhlé smrti (Elliott P. et al., 2014). Příbuzní, kteří nejsou nositeli patogenní mutace identifikované v dané rodině, nejsou v riziku rozvoje onemocnění, při absenci symptomů nepotřebují další kardiologické sledování a nemohou přenést HCM na svoje potomky. V situaci, kdy genetické vyšetření není dostupné nebo neidentifikuje patogenní mutaci u probanda je možnost identifikace nositelů

mutace před rozvojem fenotypu omezená. Znamky hypertrofie levé komory na EKG jsou citlivým, ale málo specifickým ukazatelem (Charron P. et al., 1997). Několik echokardiografických parametrů bylo asociováno s pozitivním genotypem před vznikem hypertrofie, ale výsledky jednotlivých prací jsou často kontroverzní a konkrétní parametry jsou pravděpodobně málo specifické. Rychlosti pohybu mitrálního anulu z tkáňového dopplerovského vyšetření (jako citlivý ukazatel časných stádií poruchy diastolické funkce) se jeví zejména u mladých lidí jako proměnné schopné diskriminovat jedince s patogenní mutací, ale další práce tyto výsledky nepotvrdily (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). Jedna práce prezentovala ukazatel kombinující funkční a morfologické echokardiografické parametry jako způsob identifikace nositelů mutace (Gandjbakhch E. et al., 2010). Žádná ze zmíněných metod nedosahuje v identifikaci nositelů mutace přesnost genetického vyšetření, ale pro nezanedbatelnou část rodin s negativním nebo neprůkazným genetickým vyšetřením představují jedinou možnost stratifikace příbuzných vzhledem k riziku rozvoje HCM a umožňují intenzivnější sledování vybraných jedinců.

## 1.9. Léčba

Klinický význam HCM je dán jejími závažnými kardiovaskulárními důsledky, mezi které patří riziko náhle srdeční smrti, morbidita a mortalita srdečního selhání a vznik cévních mozkových příhod (jako důsledek tromboembolizačních komplikací při fibrilaci síní, Maron BJ, Maron MS. 2013). 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 (i přes změnu některých echokardiografických parametrů, Ho CY. et al., 2015, Axelsson A. et al., 2015). Všechny klinické dopady nemoci ale lze terapeuticky ovlivnit.

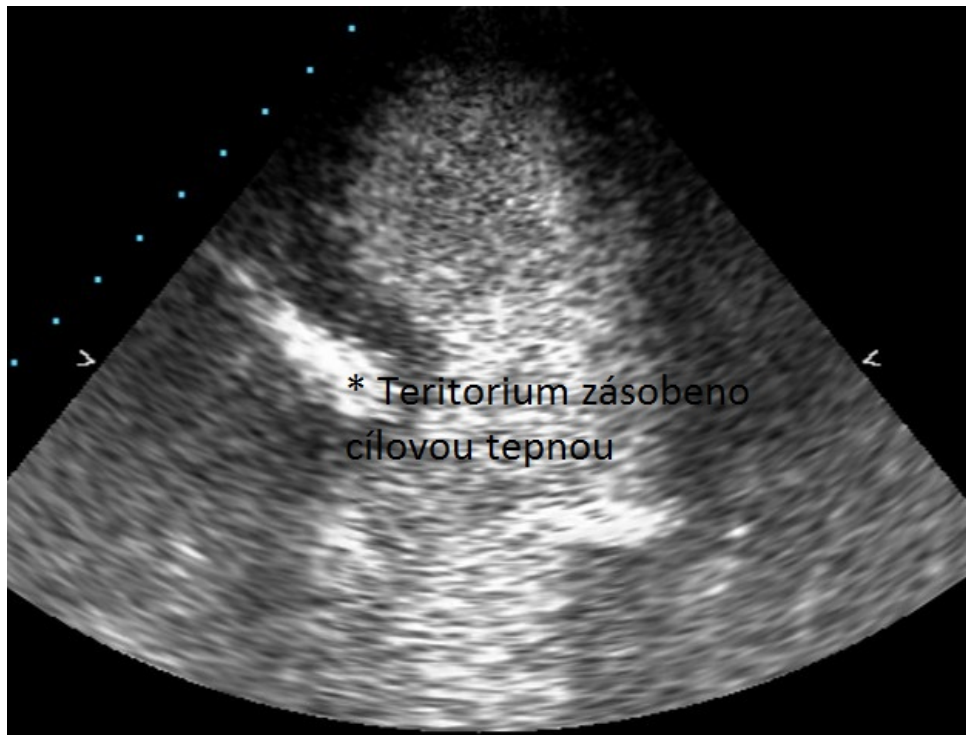
V léčbě nitrokomorové obstrukce se kromě režimových opatření jako je prevence hypovolémie, abstinence od alkoholu, redukce tělesné hmotnosti a neužívání diuretik a vazodilatátorů (jako jsou nitráty nebo inhibitory fosfodiesterázy 5) využívají farmakologické i nefarmakologické postupy. Farmakoterapie je při absenci randomizovaných studií založena na konsenzu a nerandomizovaných pracích. Lékem první volby jsou betablokátory, při jejich kontraindikaci nebo nedostatečném účinku lze podávat non-dihydropyridinové blokátory kalciových kanálů (verapamil a diltiazem). Obě kategorie léků lze kombinovat s

antiarytmikem IA třídy s negativním inotropním účinkem, disopyramidem (není v ČR registrován). U pacientů s limitujícími symptomy (NYHA třída III-IV, případně opakované synkopy při fyzické námaze) navzdory podávané farmakoterapii, nebo při intoleranci farmakoterapie a nadále trvající významné nitrokomorové obstrukci (gradient nad 30 mm Hg) se k léčbě obstrukce používají i nefarmakologické metody. Tradiční procedurou je v takovém případě chirurgická myektomie, při které se vyřízne část hypertrofického bazálního interventrikulárního septa, což vede k redukcí tlakového gradientu a úlevě od symptomů. V případě midventrikulární obstrukce se myektomie může prodloužit distálně do úrovně středních segmentů levé komory. Součástí chirurgického výkonu může být i výkon na mitrální chlopni a jejím závěsném aparátu v případě významné mitrální insuficience (Elliott P. et al., 2014).

Méně invazivní alternativou nefarmakologické léčby obstrukce je katetrizační alkoholová septální ablace, u které se podáním malého množství alkoholu do tepny zásobující bazální část interventrikulárního septa (nejčastěji ramus septalis anterior z ramus interventricularis anterior) vyvolá cílená nekróza myokardu omezeného rozsahu (Sigwart U., 1995). Ta vede k poruše kontraktility a při vývoji jizvy i k redukcí hypertrofie v této oblasti a k redukcí obstrukce v LVOT (Veselka J. et al., 2005). Během procedury je teritorium zásobené cílovou větví koronárního řečiště zobrazeno pomocí kontrastní echokardiografie (Obr. 1.27., Zemanek D. et al., 2010). Neexistuje randomizované porovnání myektomie a alkoholové septální ablace, z nerandomizovaných dat se ukazuje, že ASA má větší riziko vzniku kompletního atrioventrikulárního bloku a nutnosti implantace trvalého kardiostimulátoru a vyšší reziduální tlakový gradient v LVOT, ale vede k porovnatelné úlevě od symptomů jako chirurgická myektomie. Procedurální mortalita obou výkonů byla považována za podobnou, nedávná práce s výsledky celonárodní analýzy provedených výkonů v USA ukazuje výrazně vyšší mortalitu u myektomie (Alam M. et al., 2009, Veselka J. et al., 2016, Kim LK. et al., 2016). Kromě alkoholu lze katetrizačně k vyvolání nekrózy použít i odpoutatelné cívky ("coily") nebo kyanoakrylát, případně aplikaci radiofrekvenční energie z dutiny komor (Riedlbauchova L. et al., 2013). Publikované výsledky těchto metod se týkají menších souborů pacientů bez dlouhodobého sledování.

Trvalá dvoudutinová kardiostimulace s nastavením krátkého atrioventrikulárního intervalu a polohou komorové elektrody v hrotu pravé komory vede podle několika prací s malými kohortami pacientů k redukcí obstrukce v LVOT (v menší míře než ASA) a k variabilním změnám v symptomech (Qintar M. et al., 2012). O této metodě léčby nitrokomorové

obstrukce lze uvažovat u pacientů odmítajících nebo kontraindikovaných k jiným nefarmakologickým metodám a s jinými indikacemi k trvalé kardiostimulaci.



Obr. 1.27.

Transtorakální echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce u pacientky během ASA výkonu. Power-dopplerovské kontrastní zobrazení ukazuje teritorium myokardu v bazální části interventrikulárního septa, které je zásobeno cílovou tepnou.

Léčba srdečního selhání u pacientů bez nitrokomorové obstrukce je založena zejména na farmakoterapii. U pacientů se zachovalou systolickou funkcí levé komory srdeční je cílem farmakoterapie snížení plnicích tlaků levé komory pomocí zpomalení tepové frekvence (pomocí betablokátorů, verapamilu, diltiazemu) a opatrnou diuretickou léčbou. V případě snížené systolické funkce se k terapii přidávají rovněž léky zasahující do renin-angiotensin-aldosteronového systému (inhibitory angiotensin-konvertujícího enzymu, sartany, blokátory aldosteronových receptorů). U pacientů se supraventrikulárními tachykardiemi (nejčastěji fibrilace síní) vede kontrola rytmu nebo kontrola frekvence k úlevě od symptomů srdečního selhání (Elliott P. et al., 2014).

Existuje málo dat o srdeční resynchronizační terapii (pomocí biventrikulární stimulace) u HCM, ale regionální heterogenita kontrakce je u pacientů s HCM častá a v jedné studii vedla resynchronizační terapie k redukci symptomů srdečního selhání (Rogers DP. et al., 2008), proto je doporučena u pacientů se systolickou dysfunkcí levé komory (ejekční frakce pod 50

%) a rozšířeným QRS komplexem v trvání nad 120 ms morfologie blokády levého raménka Tawarova (LBBB). U pacientů s refrakterním srdečním selháním funkční třídy NYHA III-IV navzdory farmakoterapii a při absenci významné nitrokomorové obstrukce představuje poslední léčebnou možností transplantace srdce. Většina těchto pacientů se nachází ve stadiu nemoci s těžkou systolickou dysfunkcí levé komory. Minoritní indikací k transplantaci jsou u HCM i neřešitelné komorové arytmie. Pacienti s HCM tvoří malou část nemocných podstupujících transplantaci (1-7 %, Kato TS. et al., 2012).

Nejčastější arytmií u pacientů s HCM je fibrilace síní. Vzniká v důsledku dilatace levé síně a zvýšení tlaku v levé síni při srdečním selhání, nitrokomorové obstrukci a mitrální regurgitaci. Její prevalence je u HCM téměř 25 %. Prevalence tromboembolických komplikací je pak u pacientů s fibrilací síní u HCM rovněž přibližně 25 % (Guttmann OP. et al., 2014). Vzhledem k takto vysokému riziku je u všech pacientů s HCM při vzniku fibrilace síní doporučována antikoagulační terapie, bez ohledu na hodnotu jejich CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc skóre (skórovací systém stanovující riziko tromboembolických komplikací zahrnující přítomnost srdečního selhání, věk, diabetes mellitus, anamnézu cévní mozkové příhody, cévní postižení a ženské pohlaví používaný k indikaci antikoagulační terapie u nonvalvulární fibrilace síní, Elliott P. et al., 2014). Ostatní aspekty léčby fibrilace síní včetně kontroly frekvence a rytmu a katetrizační ablace jsou stejné jako u pacientů bez HCM.

Náhlá smrt je důležitým faktorem podílejícím se na mortalitě pacientů s HCM. Nejčastější arytmií, která u HCM způsobí náhlou smrt je fibrilace komor, ale byly dokumentovány i asystolie, atrioventrikulární blok a elektromechanická disociace (Nicod P. et al., 1988). K predikci rizika náhlé smrti u HCM, o kterou se pak opírá i její prevence, se používá identifikace rizikových faktorů v anamnéze pacientů a ve výsledcích pomocných vyšetření. Doporučené postupy ACCF/AHA sledují výskyt rodinné anamnézy náhlé smrti, přítomnost nevysvětlené synkopy, hypertrofie levé komory nad 30 mm, nesetrválých komorových tachykardií na ambulantním monitorování EKG a abnormální tlakové reakce během fyzické zátěže (Gersh BJ. et al., 2011). Pacienti s těmito faktory jsou ve vyšším riziku náhlé smrti. Tento stratifikační systém nepredikuje absolutní riziko náhlé smrti, ale identifikuje pacienty s relativně zvýšeným rizikem. Za pomocné faktory, jejichž přítomnost může ovlivnit rozhodování o léčbě pacientů ve středním riziku se považuje přítomnost fibrózy myokardu na magnetické rezonanci, apikálních aneuryzmat a vícečetných mutací v sarkomerických genech. V doporučených postupech ESC byl navržen nový skórovací systém odhadující absolutní hodnotu pětiletého rizika náhlé smrti, který ji vypočítává z věku, maximální tloušťky levé komory, velikosti levé síně, velikosti gradientu nitrokomorové obstrukce, přítomnosti

nesetrválých komorových tachykardií na ambulantním monitorování EKG, nevysvětlené synkopy a rodinné anamnézy náhlé smrti (Elliott P. et al., 2014). Tento systém navíc umožňuje kontinuálním veličinám přisoudit různou váhu podle jejich absolutní hodnoty. Ani jeden z používaných stratifikačních systémů není dokonalý v identifikaci nemocných ohrožených náhlou srdeční smrtí, americký se jeví být senzitivnějším za cenu nízké specificity, ten evropský zase méně senzitivním (Jahnlova D. et al., 2015).

Prevence náhlé srdeční smrti je založena na několika doporučeních a terapeutických postupech. I když většina epizod náhlé srdeční smrti vzniká bez fyzické námahy, pacientům s HCM, zejména při přítomnosti rizikových faktorů náhlé smrti, se nedoporučuje vykonávat velkou fyzickou aktivitu a participovat ve vrcholových sportech (Gersh BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). Žádná antiarytmická léčba nemá přesvědčivě prokázaný efekt na snížení rizika náhlé smrti u HCM, amiodaron v jedné observační studii snižoval riziko náhlé smrti u pacientů se zachycenými nesetrválými komorovými tachykardiemi na ambulantním monitorování EKG, v jiných observačních pracích ale nedokázal náhlou smrt potlačit (McKenna WJ. et al., 1985, Melacini P. et al., 2007). Nejdůležitějším opatřením v prevenci náhlé smrti je tak u HCM implantace kardioverteru-defibrilátoru. Sekundární prevence náhlé smrti se týká malé části pacientů po úspěšné resuscitaci pro fibrilaci komor a setrvalou komorovou tachykardii, kteří jsou ve vysokém riziku dalších arytmiických příhod (Elliott P. et al., 1999). V primární prevenci náhlé smrti se indikuje implantace kardioverteru-defibrilátoru podle jednoho ze zmíněných stratifikačních systémů (Gerch BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). Pouze menšina pacientů s implantovaným kardioverterem-defibrilátorem obdrží adekvátní výboj terminující život ohrožující arytmii, na druhou stranu mnohaletá léčba pomocí implantabilního kardioverteru-defibrilátoru je zatížena rizikem neadekvátních výbojů a dalších komplikací. Při nedokonalosti stratifikačních systémů k predikci rizika náhlé smrti je potřebné u každého pacienta před implantací kardioverteru-defibrilátoru individuální posouzení přínosu a rizik terapie. Role genetického vyšetření v upřesnění rizika náhlé smrti je prozatím omezená. Jak již bylo zmíněno, některé mutace byly asociovány s vyšším rizikem náhlé smrti, tyto výsledky jsou ale založené na malých kohortách pacientů a často raritních mutacích a nedaří se je reprodukovat v nepříbuzných populacích. Doporučené postupy ACCF/AHA uznávají přítomnost vícečetných mutací v sarkomerických genech jako pomocné kritérium při stanovení rizika. Pacienti s vícečetnými mutacemi mají kromě vyššího rizika i větší míru hypertrofie a větší riziko dalších klinických příhod včetně srdečního selhání.

## 2. Cíle práce

Genetické vyšetření pacientů s HCM má široký potenciál ve zlepšení poznatků o etiologii a patofyziologii onemocnění a predikci rozvoje jednotlivých charakteristik fenotypu a klinických důsledků této heterogenní kardiomyopatie. Kromě samotných pacientů je genetické vyšetření nepostradatelné v péči o jejich příbuzné.

Při zmíněné genetické heterogenitě je většina pacientů s HCM nositeli mutace v jednom z genů pro sarkomerické proteiny a malá část nemocných trpí některým z metabolických onemocnění, vrozených syndromů, mitochondriálních kardiomyopatií, neuromuskulárních chorob nebo střeďavých onemocnění (Elliott P. et al., 2014). Nadále ale existuje početná část pacientů s fenotypem HCM bez záchytu mutace v 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. Při dominantním zastoupení dvou genů v genetice HCM (*MYH7* a *MYBPC3*) a malé frekvenci identifikovaných mutací v ostatních genech bude očekávaná četnost mutací v potenciálních nových genech pro HCM nízká (kolem 1 %). Primárním cílem naší práce bylo identifikovat nové patogenní mutace pro HCM metodou výběru kandidátního genu pro protein nebulin (gen *NEBL*), který doposud nebyl se vznikem HCM asociován.

Pacienti s přítomnou mutací v sarkomerických genech se od nemocných bez identifikované mutace 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, Gersch B.J. et al., 2011). Pozitivní výsledek genetického vyšetření je u pacientů s těmito klinickými parametry častější podle zahraničních prací. 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. Rovněž předpokládáme, že selekce pacientů indikovaných ke genetickému vyšetření na základě klinických parametrů dokáže zlepšit výtěžnost tohoto vyšetření.

V rodinách bez provedení genetického vyšetření a při negativním 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 na věku. Několik echokardiografických parametrů bylo asociováno s nosičstvím patogenní mutace před rozvojem fenotypu, 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. Diagnóza HCM byla určena dle doporučených postupů ESC na základě zobrazení hemodynamicky nevysvětlené hypertrofie levé komory srdeční echokardiografickým vyšetřením nebo magnetickou rezonancí srdce (Elliott P. et al., 2014). Pacientům byla nabídnuta účast v navrhované studii a v případě souhlasu jim byla po podepsání informovaného souhlasu odebrána krev z periferní žíly na genetické vyšetření. Pro analýzu kandidátního genu *NEBL* pro protein nebulin bylo vyšetřeno 95 konsekutivních pacientů z Kardiologické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. Pro určení morfologických a klinických parametrů u pacientů s identifikovanou mutací v nejčastějších sarkomerických genech bylo vyšetřeno 48 konsekutivních pacientů z Kardiologické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole. Pro práci s identifikací parametrů předpovídajících vývoj fenotypu HCM u příbuzných s pozitivním genotypem bylo vyšetřeno 99 konsekutivních pacientů (48 z Kardiologické kliniky 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole a 51 z III Interní-kardiologické kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady). 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. Po podpisu informovaného souhlasu byl příbuzným odebrán vzorek buňkové sliznice na genetické vyšetření (52 příbuzných) a provedeno kardiologické vyšetření (20 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, Berlín) 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 se sestavením rodokmene obsahujícího minimálně tři generace a s cílenými dotazy na výskyt HCM a náhlé smrti v rodině. Náhlá smrt byla definována jako úmrtí do jedné hodiny od vzniku symptomů u člověka s předchozím stabilním zdravotním stavem nebo úmrtí ve spánku. 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.

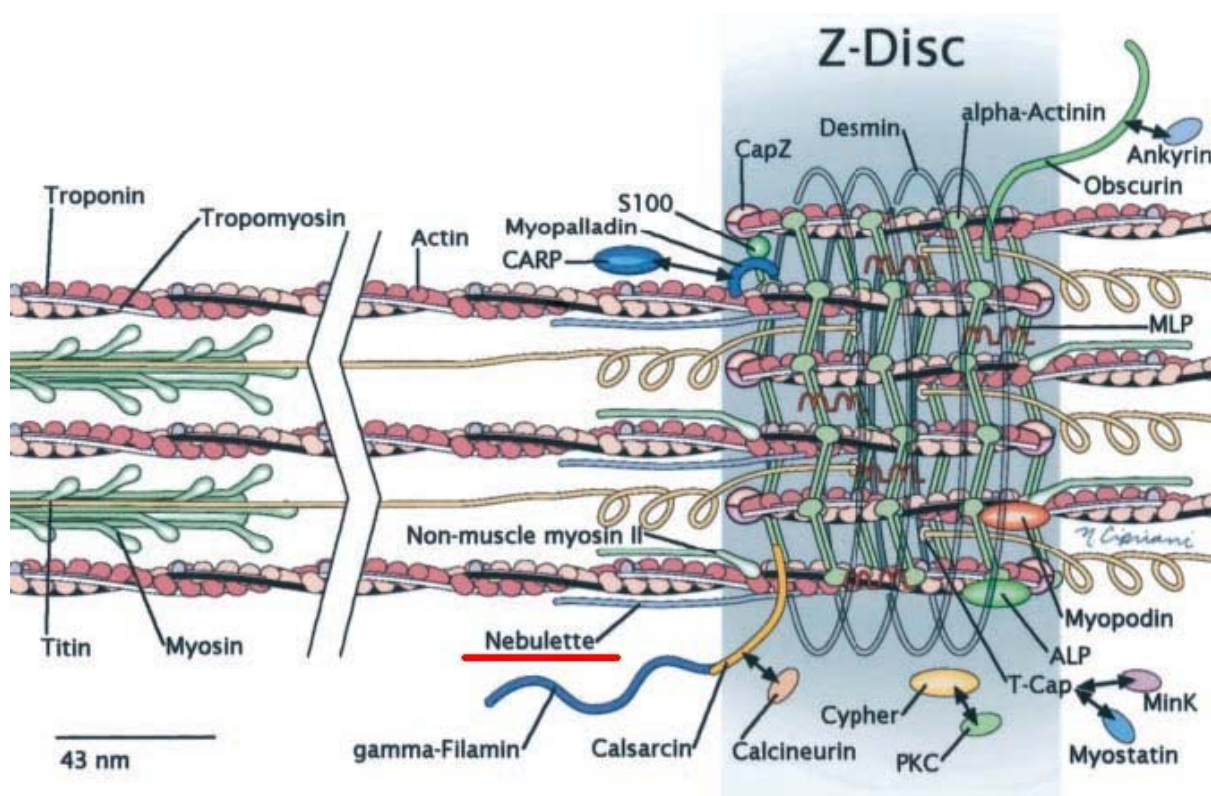
### 3.3. Echokardiografické vyšetření

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). Následující parametry byly zaznamenány v jednotlivých módech zobrazení a projekcích: M-mód v parasternální projekci na dlouhou osu: rozměr kořene aorty, rozměr levé síně, rozměr pravé komory, tloušťka interventrikulárního septa, tloušťka zadní stěny levé komory, rozměr levé komory na konci diastoly a rozměr levé komory na konci systoly; pulzní dopplerovské vyšetření v apikální čtyřdutinové projekci: vrcholová rychlost časného (E) a pozdního (A) průtoku mitrální chlopní, vrcholová rychlost ve výtokovém traktu levé komory; tkáňové dopplerovské zobrazení v apikální čtyřdutinové projekci: vrcholová systolická (Sa), časná diastolická (Ea) a pozdní diastolická (Aa) rychlost pohybu septálního okraje mitrálního anulu. Nitrokomorová obstrukce byla detekována za klidových podmínek i po provokaci Valsalvovým manévrem a 10 minut po sublinguálním podání isosorbid dinitrátu (Dimitrow PP. et al., 2009). Ejekční frakce levé komory byla vypočtena jako poměr tepového objemu a objemu levé komory na konci diastoly. Tepový objem levé komory je rozdíl objemů na konci diastoly a na konci systoly. Objemy levé komory byly vypočteny pomocí Teichholzovy rovnice:  $V=7D^3/(2,4+D)$ , kde V je objem a D rozměr levé komory.

### 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 strukturální úlohou v oblasti sarkomery nebo v její blízkosti a sledovali jsme případnou roli těchto proteinů ve vzniku jiných forem familiárních kardiomyopatií.

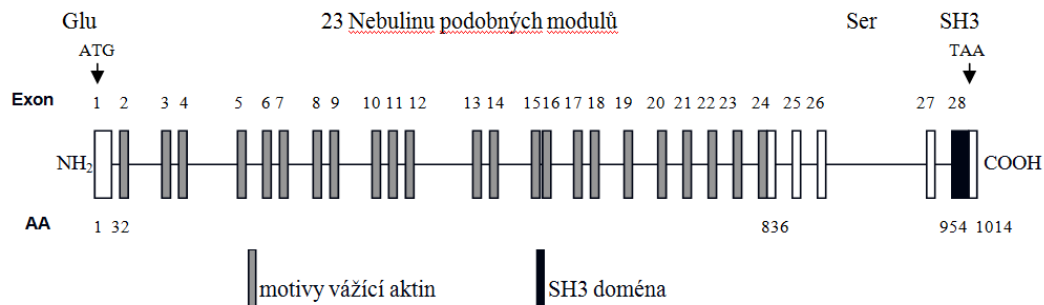
Protein nebulette je 109 kDa velký, vláknitý protein, poprvé popsán v roce 1995 na základě zkřížené imunitní reakce s protilátkami proti nebulinu (Obr. 3.1., Moncman CL., Wang K. 1995). Nebulin a nebulette jsou homologní proteiny nacházející se v blízkosti Z disků sarkomer příčně pruhovaných (nebulin) a srdečních (nebulette) svalů. Mají podobnou organizaci domén a vysokou sekvenční homologii, nebulette je ale výrazně kratším proteinem oproti nebulinu. Nebulin je tvořen rodinou proteinů, jednotlivé izoformy velikosti 600 - 900



Obr. 3.1.

Schéma Z-disku sarkomery srdečního svalu, jehož součástí je i protein nebulette (Pyle WG, Solaro RJ., 2004).

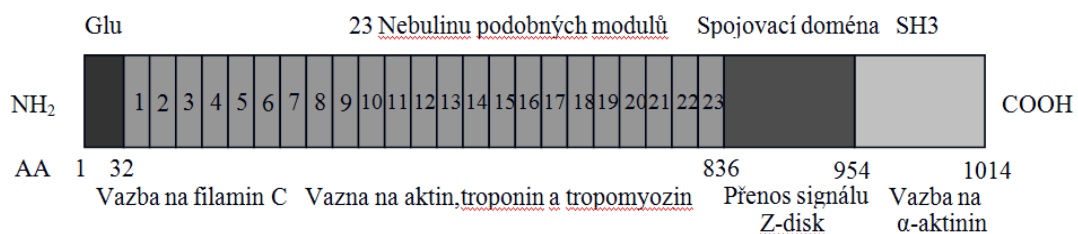
kDa vznikají alternativním sestřihem (splicing) jediného genu na chromozomu 2q21 (Pelín K. et al., 1997). Gen *NEBL* pro protein nebulette je lokalizovaný na chromozomu 10p12, skládá se z 28 exonů a kóduje protein o délce 1014 aminokyselin (Obr. 3.2). Publikované práce



Obr. 3.2.

Schéma genu *NEBL*.

prezentují kontroverzní výsledky ohledem možných existencí rozdílných izoforem proteinu nebulette vzniklých alternativním sestřihem během vývojových stádií (Moncman CL., Wang K., 2000, Arimura T. et al., 2000, Ogut O. et al., 2003). Zatímco některé nacházejí identický protein v různých částech srdce i během embryonálního vývoje, jiné naznačují možnost alternativního sestřihu exonů 17-21 a také možnost připojení LIM domény k N-terminálnímu konci proteinu v embryonálních i dospělých srdcích. Struktura proteinu se skládá ze čtyř domén (Obr. 3.3.): 1) N-terminální konec proteinu je bohatý na kyselinu glutamovou, 2) centrální



Obr. 3.3.

Schéma proteinu nebulette.

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). Spojovací a C-terminální doména slouží k ukotvení proteinu do Z-disku sarkomery a díky fosforylačním místům mají pravděpodobně i regulační funkci na schopnost vazby nebulette na vlákna aktinu. Tato vazba je hlavní funkcí největší centrální domény s 23 moduly o délce 35 aminokyselin, které obsahují SDXXYK motiv, typický pro nebulinovou rodinu proteinů. Moduly 15-23 navíc obsahují další opakující se motiv PEIXRXX. Centrální doména je kromě aktinu schopna i interakce s tropomyozinem a troponinem T. N-terminální doména se na druhou stranu váže s filaminem C a C-terminální SH3 doména s  $\alpha$ -aktininem, toto spojení je zprostředkováno přes myopalladin (Bang ML. et al., 2001, Esham M. et al., 2007, Holmes WB., Moncman CL. et al., 2008). Nebulette se tím podílí na vzájemném ukotvení aktinu a  $\alpha$ -aktininu. Nebulin se v kosterním svalstvu podílí na regulaci délky tenkých filament sarkomery (McElhinny AS. et al., 2005). Jelikož je ale nebulette výrazně kratší protein (obsahuje 23 nebulinu podobných modulů oproti 185 u nebulinu) a nedosahuje přes celou délku aktinových vláken, pravděpodobně tuto úlohu v srdečním svalu nezastává. 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. Role SH3 domén v transdukcii signálu je spjata s jejich interakcí s oblastmi jiných proteinů bohatých na prolin. Protože region  $\alpha$ -aktininu, na který se SH3 doména nebulette váže není bohatý na prolin, předpokládá se existence doposud neidentifikovaného proteinového partnera, se kterým se nebulette podílí na regulaci přenosu signálu (Moncman CL., Wang K., 1995, Ram R., Blaxall BC., 2010).

Genetické varianty v genu *NEBL* byly asociovány s DCM. V japonské populaci pacientů s idiopatickou DCM byly identifikovány čtyři genetické polymorfizmy vedoucí k záměně jedné aminokyseliny v řetězci nebulette. Tyto genetické varianty se ale nacházejí i ve zdravé populaci. Jedna z nich je u pacientů s idiopatickou DCM nalézána ve vyšší frekvenci než u zdravé populace a považuje se tedy za možný genetický marker DCM (Arimura T. et al., 2000). U pacientů s familiární formou DCM byly nalezeny mutace, které byly dále zkoumány na zvířecím modelu. Jejich zvýšená exprese na myších vedla k výraznému fenotypu DCM včetně časně fatálních forem (Purevjav E. et al., 2010).

Mutace v genu pro nebulin patří mezi hlavní příčiny geneticky i klinicky heterogenního onemocnění kosterního svalstva - nemalinové myopatie (Pelin K. et al., 1997). Jde o onemocnění s progresivní svalovou slabostí a s histologickým průkazem poruchy stavby Z-

disků sarkomery a vzniku proteinových agregátů Z-disků a tenkých filament. Tíže projevů je velmi variabilní od fatálních po lehké formy onemocnění. Kromě genu pro nebulin se na vzniku nemalinné myopatie podílejí mutace ve čtyřech dalších genech.

Informace dostupné o proteinu nebulině a genu *NEBL*, konkrétně jejich význam pro správnou strukturu a funkci sarkomery, role homologního proteinu nebulinu v onemocnění kosterních svalů a asociace genetických variant v *NEBL* se vznikem DCM vedly k výběru tohoto genu jako kandidátního genu k hledání doposud neobjevených mutací způsobující HCM.

### 3.5. Odběr vzorků pro genetické vyšetření a izolace DNA

Pro účely genetického vyšetření bylo pacientům s HCM za sterilních kautel odebráno 2 ml krve z periferní žíly do zkumavky s EDTA (etilendiamino tetraoctová kyselina), které byly v den odběru zpracovány s cílem izolace DNA. U příbuzných pacientů s identifikovanou mutací byly k odběru vzorků použity odběrové tampony FLOQ Swabs (Copan Flock Technologies, Brescia, Itálie) k získání buněk bukové sliznice. Příbuzní byli poučeni o správném odběru, který prováděli sami nebo v ordinacích svých praktických lékařů po 60-ti minutách nalačno rotačním i posuvným pohybem odběrového tampónu po bukové sliznici a následně jej uložili zpět do původní zkumavky a zaslali ke genetickému vyšetření. 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). Metoda popsaná v roce 1983 vede k mnohonásobné amplifikaci úseku DNA nacházejícího se mezi dvěma specifickými oligonukleotidovými sekvencemi (primery) v délce 17 - 28 nukleotidů, vážícími se na komplementární řetězce DNA (Mullis KB., Faloona FA., 1987). K amplifikaci dochází enzymatickou in-vitro syntézou DNA v cyklicky se opakujících krocích zahrnující denaturaci dvouvláknové DNA na samostatná vlákna, hybridizaci primerů, které jsou v roztoku v nadbytku a jejichž volný 3'OH konec funguje jako startovací místo syntézy DNA podle předlohy tvořené jednovláknovou DNA a elongace řetězce pomocí termostabilní DNA polymerázy. Následně dochází opět k denaturaci i nově vzniklých dvouvláknových molekul DNA a opakování celého cyklu. Když v dalším cyklu

dochází k hybridizaci nově vytvořeného vlákna DNA s primerem opačné orientace, výsledkem elongace DNA je krátký řetězec mezi oběma primery, syntéza končí v místě původního primeru, protože k další extenzi řetězce již chybí předloha. Primer, který začíná na 5' konci genu a elonguje se ve směru transkripce se označuje jako kódující (forward) a primer vážící se na komplementární vlákno DNA na druhém konci amplifikovaného úseku a elongující se proti směru transkripce genu se označuje jako antikódující (reverse). Díky opačné orientaci primerů dochází k amplifikaci DNA produktu, jehož délka je rovná přesně vzdálenosti mezi primery - množství produktu s cílovou délkou roste během PCR exponenciálně. Během reakce vznikají i produkty delší, které vznikají podle předlohy původní DNA, jejich množství ale roste pouze lineárně a je vzhledem k počtu opakujících se cyklů ve výsledném produktu zanedbatelné. K provedení jednotlivých kroků je potřeba cyklicky měnit teplotu roztoku, denaturace probíhá při teplotě kolem 95 °C, hybridizace primerů podle jejich sekvence při teplotách 50 - 70 °C a elongace DNA při teplotách 65 - 75 °C. Cyklické změny teploty jsou automatizované a probíhají v termocykleru.

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* a *TNNT2* 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 použita Sangerova sekvenace. Metoda využívá enzymatickou in-vitro syntézu DNA podle předlohy, kterou tvoří sekvenovaný úsek DNA, analogicky k PCR (Sanger F., Coulson AR., 1975). Tentokrát se ale v roztoku nachází vždy pouze jeden primer a kromě klasických deoxynukleotidů jako materiálu k elongaci DNA i dideoxynukleotidy jednotlivých bází. V případě náhodného zabudování dideoxynukleotidu namísto deoxynukleotidu do elongovaného řetězce dochází k zástavě syntézy vlákna DNA, protože dideoxynukleotid postrádá 3'OH skupinu potřebnou k navázání dalšího nukleotidu. Ve výsledném produktu tak vznikají řetězce různé délky zakončené některým z dideoxynukleotidů. Každý z dideoxynukleotidů je značen jedním ze čtyř fluorescenčních markerů, podle toho, kterou bázi obsahuje. Syntetizované řetězce jsou rozděleny podle své

délky kapilární elektroforézou a rozdíly v absorpčním maximu jednotlivých fluorescenčních markerů jsou detekovány argonovým laserem. Celý proces je automatizován a probíhá v sekvenátoru. Výsledná data jsou zpracována pomocí dedikovaného softwaru.

K enzymatickému vyčištění PCR produktů před sekvenací byla použita rekombinantní alkalická fosfatáza (Shrimp alkaline phosphatase) a exonukleáza Exo I. K vyčištěnému produktu se poté přidal zvolený primer a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, obsahující deoxynukleotidy, značené dideoxynukletidy, DNA polymerázu a puffer. 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

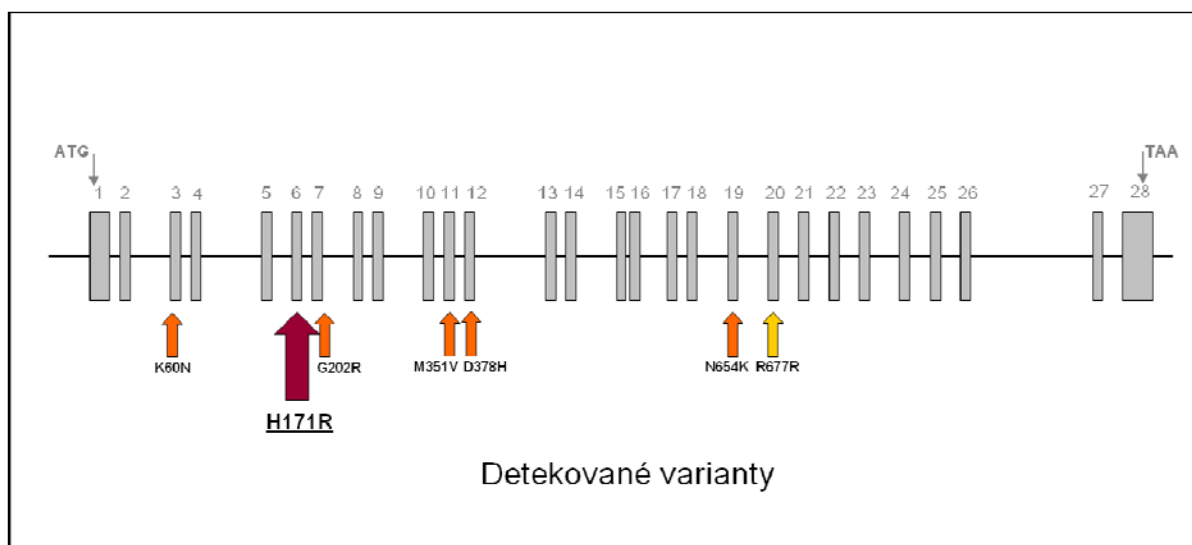
K porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi pacienty a jejich příbuznými s identifikovanou genetickou variantou a bez identifikované genetické varianty jsme použili neparametrický Mannův-Whitneyho test u spojitých proměnných a Fisherův test u kategoriálních proměnných. Hodnota  $p <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



## 4. Výsledky

### 4.1. Genetické varianty v genu NEBL

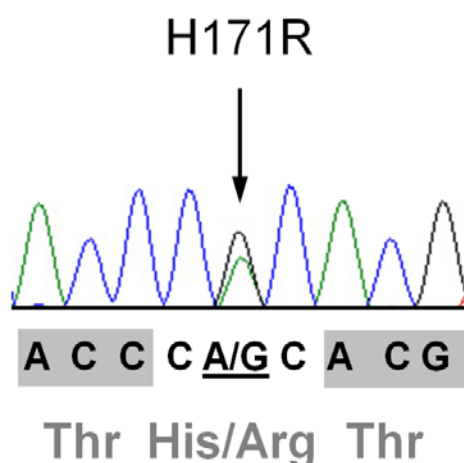
Při sekvenování všech kódujících exonů genu *NEBL* jsme v kohortě 95 pacientů identifikovali 6 genetických variant (Obr. 4.1.). Pět z nalezených variant byly známé jednonukleotidové polymorfismy (4 nesynonymní a 1 synonymní), poslední variantou (p.H171R, Obr. 4.2.) byl nově objevený nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus (Tab. 4.1.).



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



Obr. 4.2.

Elektroferogram z DNA sekvenace demonstrující heterozygotitu v genetické variantě p.H171R u pacienta s HCM.

DNA	Protein	Exon	Varianta	Známá/nová	dbSNP ID
c.180G>C	p.K60N	3	nsSNP	známá	rs41277374
<b>c.521A&gt;G</b>	<b>p.H171R</b>	<b>6</b>	<b>nsSNP</b>	<b>nová</b>	-
c.604G>A	p.G202R	7	nsSNP	známá	rs137973321
c.1051A>G	p.M351V	11	nsSNP	známá	rs4025981
c.1132G>C	p.D378H	12	nsSNP	známá	rs41277370
c.1962T>A	p.N654K	19	nsSNP	známá	rs4748728
c.2031G>A	p.R677R	20	sSNP	známá	rs1006363

Tab. 4.1.

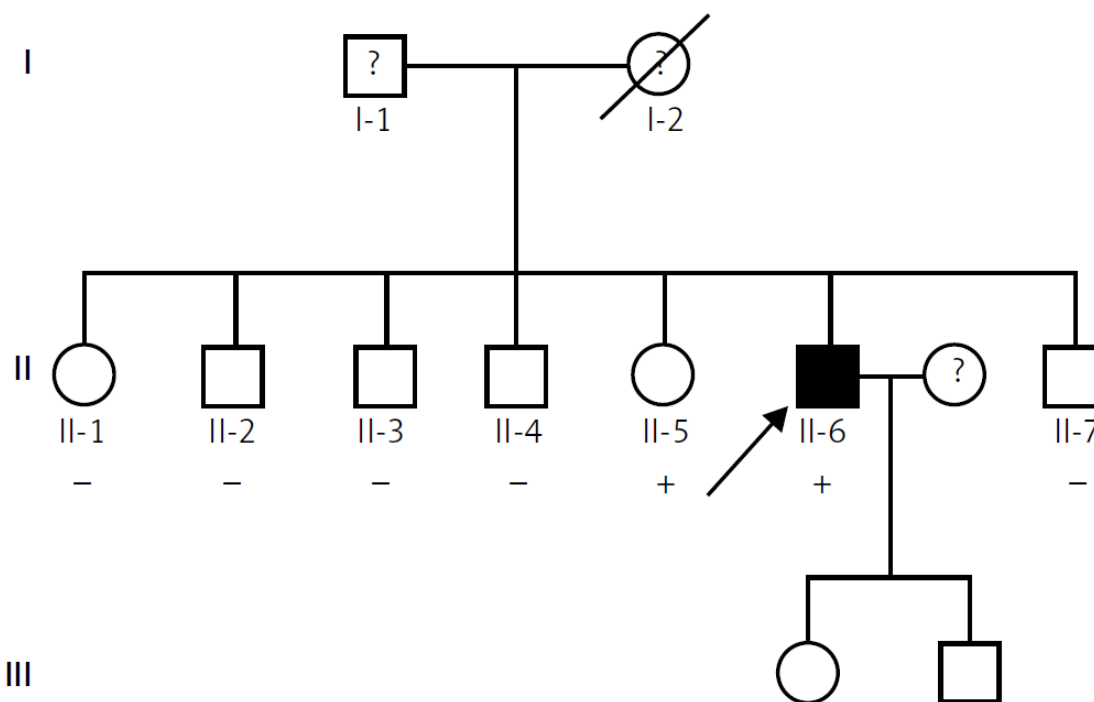
Genetické varianty detekované v genu *NEBL*. (nsSNP – nesynonymní jednonukleotidový polymorfismus, sSNP – synonymní jednonukleotidový polymorfismus, dbSNP ID – identifikační číslo varianty v databázi dbSNP).

nebulette a je vysoce konzervována v ortologních proteinech jiných obratlovců (Tab. 4.2.). Dopad této varianty na funkci proteinu byl při predikci pomocí PolyPhen2 označen jako pravděpodobně poškozující a při predikci pomocí MutationTester jako vedoucí k onemocnění. Rodokmen pacienta s nově objevenou variantou p.H171R je na Obr. 4.3. Nemocný měl stanovenou diagnózu HCM v 53 letech na základě echokardiografického vyšetření indikovaného pro námahovou dušnost třídy NYHA II a EKG známky hypertrofie levé

Sekvence	Kodón								
	167	168	169	170	<b>171</b>	172	173	174	175
Varianta p.H171R	V	Q	D	T	<b>R</b>	T	Y	S	A
Lidská referenční	V	Q	D	T	<b>H</b>	T	Y	S	A
Šimpanz	V	Q	D	T	<b>H</b>	T	Y	R	A
Pes	V	Q	D	T	<b>H</b>	M	Y	S	A
Kočka	V	Q	D	T	<b>H</b>	T	Y	S	A
Myš	M	Q	G	T	<b>H</b>	T	Y	T	A
Kur domácí	V	Q	D	T	<b>H</b>	R	Y	T	E
Čtverzubec	K	E	E	L	<b>H</b>	H	Y	K	T

Tab. 4.2.

Proteinový kód v okolí nově objevené genetické varianty v genu *NEBL* a jeho konzervovanost napříč druhovým spektrem.



Obr. 4.3.

Rodokmen pacienta s HCM s nově objevenou genetickou variantou p.H171R.

komory. Byla u něj identifikována přítomnost hypertrofie levé komory srdeční s maximálním vyjádřením v bazální části interventrikulárního septa, kde dosahovala 18 mm, tloušťka inferolaterální stěny levé komory byla 13 mm. U pacienta nebyla dokumentována významná nitrokomorová obstrukce v klidu ani po provokaci Valsalvovým manévrem a po sublinguálním podání isosorbid dinitrátu. Provedením stratifikace rizika náhlé smrti nebyly nalezeny žádné z rizikových faktorů a pacientovi nebyla doporučena implantace kardioverteru-defibrilátoru. Byla zahájena farmakologická léčba betablokátozem (metoprolol sukcinát 50 mg/den per os) s částečnou úlevou námahové dušnosti. 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 (II-2, II-3 a II-4) měli hraniční tloušťku stěny levé komory 11 až 12 mm při několikaleté anamnéze léčené arteriální hypertenze. Pacientova sestra (II-5, 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

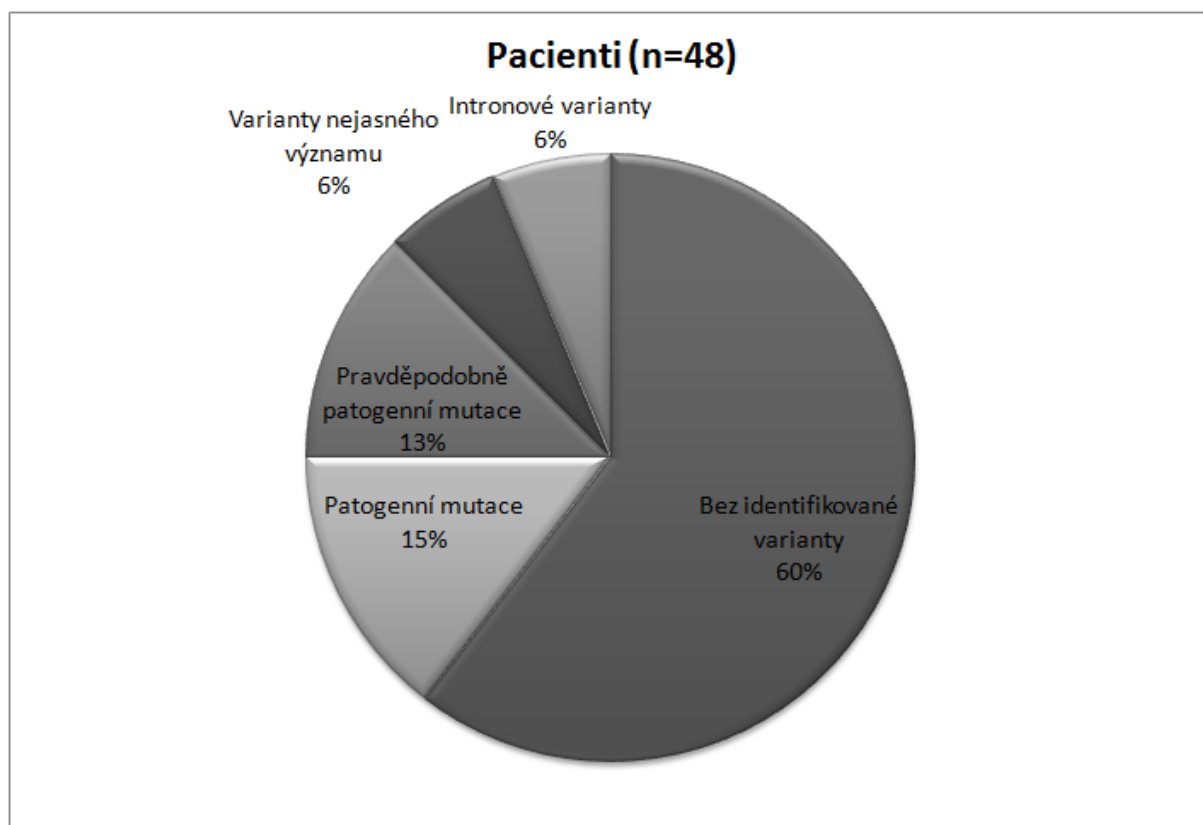
V kohortě 48 pacientů s HCM (základní charakteristika souboru v Tab. 4.3.), vyšetřených na přítomnost genetických variant v nejčastějších sarkomerických genech *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3* a *TNNT2*, jsme našli varianty u 19 z nich (40 %). Sedm z těchto pacientů (15 %) byli nositeli známé patogenní mutace, 6 pacientů (13 %) mělo pravděpodobně patogenní mutaci, 3 pacienti (6 %) variantu nejasného významu a 3 pacienti (6 %) variantu v přilehlé části intronu (Obr. 4.4.). 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 našli asociaci mladšího věku v době diagnózy a reverzního typu interventrikulárního septa s přítomností patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace (Tab. 4.4.).

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

	Pacienti s HCM (n=48) Medián [IQR] nebo %
Věk (roky)	51 [43,5-63,75]
Pohlaví (muži, %)	52 %
Výška (cm)	170 [162-175]
Váha (kg)	79 [64,5-92,25]
BMI (kg.m <sup>-2</sup> )	27,66 [24,48-31,16]
Dušnost (třída NYHA)	1,75 [1-2,375]
Betablokátory (%)	67 %
ACE inhibitory (%)	23 %
Antagonisté angiotensinových receptorů (%)	8 %
Blokátory kalciových kanálů (%)	27 %
Maximální hypertrofie levé komory (mm)	18 [15,25-22]
RWT	0,67 [0,57-0,79]
LVEDD (mm)	43,5 [39-48]
LVESD (mm)	25 [21-29]
LVEF (%)	75 [74-80]
Rozměr levé síně (mm)	43,5 [39-48]
E (m/s)	0,685 [0,5825-0,89]
A (m/s)	0,82 [0,66-0,95]
LVOTO v klidu (mm Hg)	13 [6-37,75]
LVOTO po provokaci (mm Hg)	32 [9-86,5]

Tab. 4.3.

Demografická, klinická a echokardiografická charakteristika souboru pacientů s HCM. BMI - body mass index, ACE - angiotensin konvertující enzym, RWT - relativní tloušťka stěny, LVEDD - rozměr levé komory na konci diastoly, LVESD - rozměr levé komory na konci systoly, E - vrcholová rychlost časného diastolického průtoku mitrální chlopní, A - vrcholová rychlost pozdního diastolického průtoku mitrální chlopní, LVOTO - obstrukce ve výtokovém traktu levé komory.



Obr. 4.4.

Rozdělení pacientů podle identifikované genetické varianty.

	Genotyp +	Genotyp -	OR	95 % CI	P
Věk (roky, IQR)	48 [39,5-55,5]	56 [49-70]			0,028
Pohlaví (mužské, %)	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. 4.4.

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

identifikovanou genetickou variantu v nejčastějších sarkomerických genech, zatímco 70 % pacientů s reverzním septem byli nositeli mutace v některém z těchto genů (Tab. 4.5.). 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.

	Genotyp +	Genotyp -
Reverzní septum (%)	70 %	30 %
Septum sigmoideum (%)	0 %	100 %
Neutrální septum (%)	24 %	76 %

Tab. 4.5.

Zastoupení pacientů s identifikovanou patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutací v podskupinách podle morfologie interventrikulárního septa.

#### 4.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM

V kohortě 99 pacientů s HCM (základní charakteristika souboru v Tab. 4.6.), vyšetřených na přítomnost genetických variant v nejčastějších sarkomerických genech *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3* a *TNNT2* jsme našli 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 (Obr. 4.5.). Distribuce identifikovaných variant je na Obr. 4.6., až polovina z nich se nacházela v genu *MYBPC3*, zastoupení genů pro srdeční troponiny bylo podle očekávání nižší.

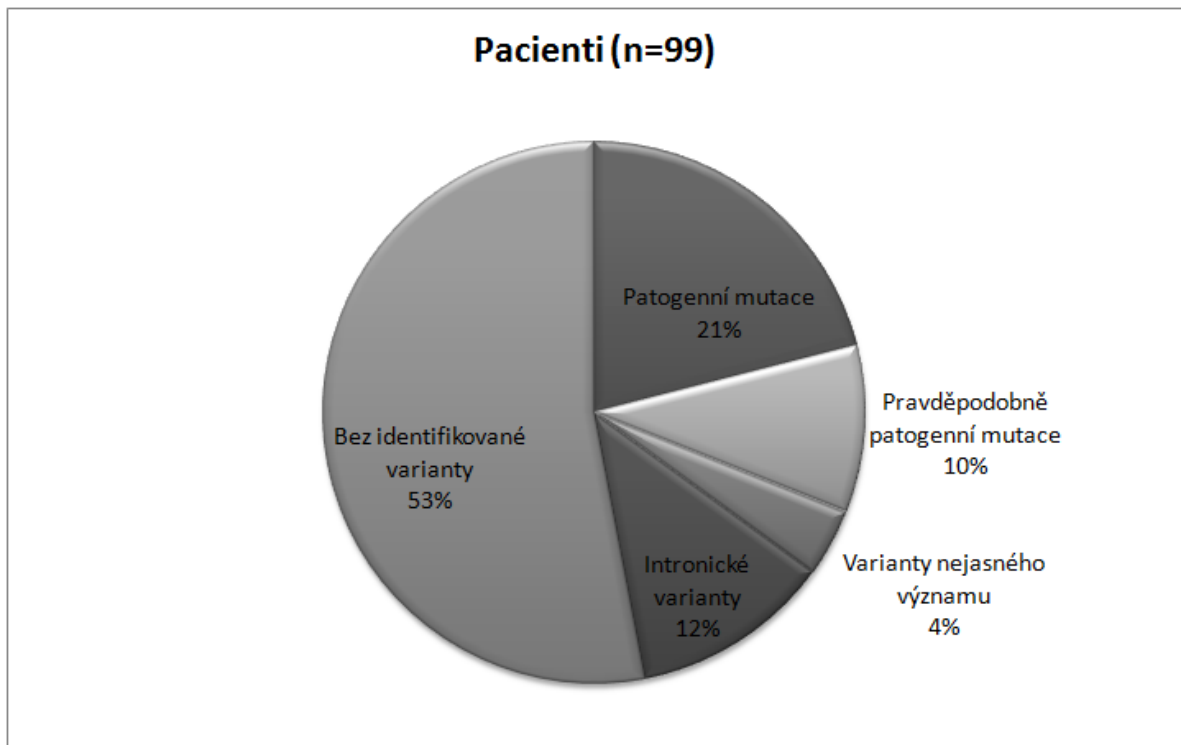
Ve 21 rodinách se známou patogenní mutací jsme provedli genetické vyšetření 52 příbuzných (18 z nich (35 %) mělo pozitivní genotyp). Dvacet z těchto příbuzných souhlasilo s klinickým vyšetřením, včetně echokardiografie (10 jedinců (50 %) z klinicky vyšetřených příbuzných mělo pozitivní genotyp). Na základě genetického vyšetření tedy mohlo být z dalšího kardiologického sledování vyřazeno 34 příbuzných s negativním fenotypem v rodinách s identifikovanou patogenní mutací. Při absenci genetického vyšetření by tyto příbuzní měli být

	Pacienti s HCM (n=99) Medián [IQR] nebo %
Věk (roky)	55 [49-62,75]
Pohlaví (muži)	58 %
BSA (m <sup>2</sup> )	1,91 [1,745-2,185]
TK systolický (mm Hg)	130 [110-140]
TK diastolický (mm Hg)	80 [70-90]
NYHA třída	2 [1-2,375]
Betablokátory (%)	77 %
ACE inhibitory (%)	26 %
Antagonisté angiotensinových receptorů (%)	6 %
Antagonisté kalciových kanálů (%)	23 %
Diuretika (%)	26 %
IVS (mm)	17 [14,75-21]
PWT (mm)	13 [12-14,5]
LVEDD (mm)	44 [40-47]
LVESD (mm)	26 [23-29]
LVEF (%)	75 [73-80]
Rozměr levé síně (mm)	43 [39-48]
E (m/s)	0,675 [0,5875-0,91]
A (m/s)	0,78 [0,69-0,91]
LVOTO v klidu (mm Hg)	13 [7,25-34,75]
LVOTO po provokaci (mm Hg)	29 [11,75-83,25]

Tab. 4.6.

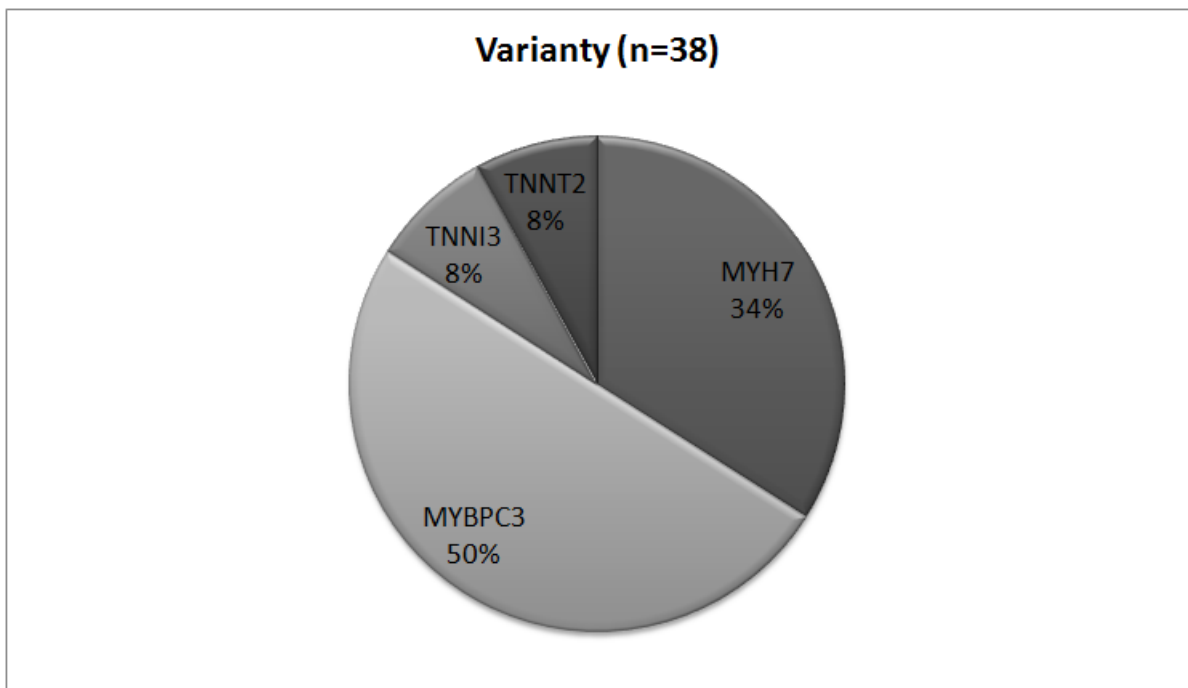
Demografická, klinická a echokardiografická charakteristika souboru pacientů s HCM. BSA - tělesný povrch, TK - krevní tlak, ACE - angiotensin konvertující enzym, IVS - interventrikulární septum, PWT - tloušťka posterolaterální stěny, LVEDD - rozměr levé komory na konci diastoly, LVESD - rozměr levé komory na konci systoly, LVEF - ejekční frakce levé komory, E - vrcholová rychlost časného diastolického průtoku mitrální chlopní, A - vrcholová rychlost pozdního diastolického průtoku mitrální chlopní, LVOTO - obstrukce ve výtokovém traktu levé komory.





Obr. 4.5.

Rozdělení pacientů podle identifikované genetické varianty.

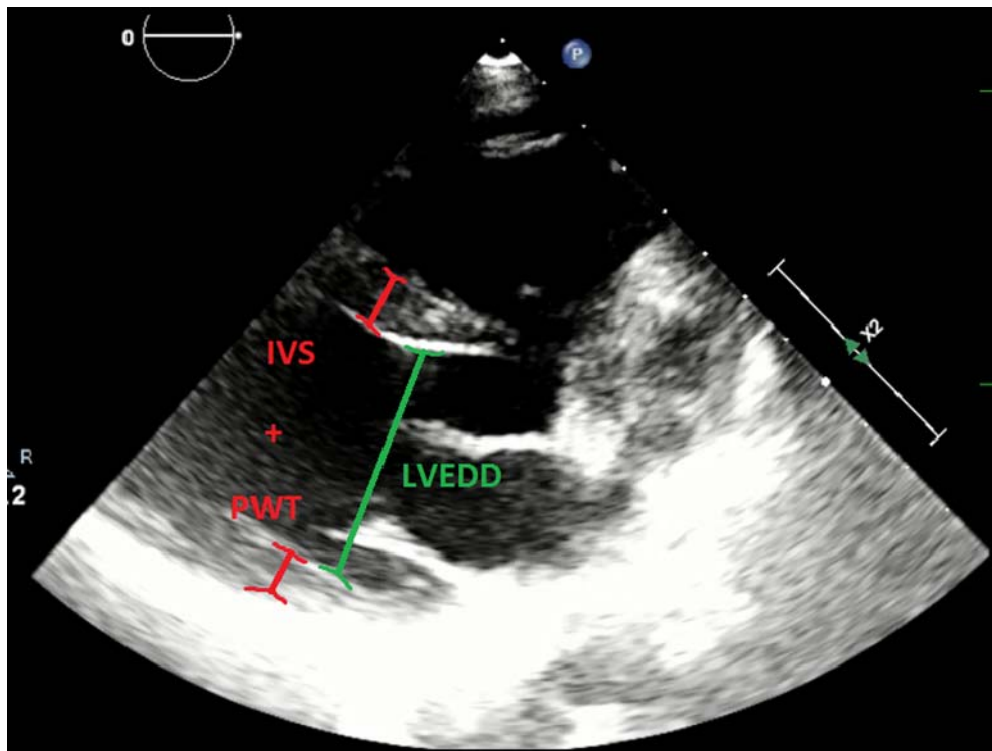


Obr. 4.6.

Rozdělení variant podle genů, ve kterých se nacházejí. MYBPC3 - myozin vazebný protein C, MYH7 - těžký řetězec  $\beta$  myozinu, TNNI3 - srdeční troponin I, TNNT2 - srdeční troponin T.

nadále sledování v pravidelných intervalech (2 - 5 let podle doporučení ESC) do 60 let věku k identifikaci rozvoje fenotypu HCM. Při analýze věku příbuzných z naší kohorty nám tak genetické vyšetření jednoho pacienta s HCM umožnilo upustit od 2,45 (při sledování každých 5 let) až 5,15 (při sledování každé 2 roky) klinických vyšetření příbuzných.

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 (Tab. 4.7.). Při malých souborech žádný ze sledovaných parametrů nedosáhl významného rozdílu s výjimkou kombinovaného echokardiografického ukazatele navrženého v práci od Gandjbakhch et al. zahrnujícího poměr tloušťky interventrikulárního septa a inferolaterální stěny, relativní tloušťku srdeční stěny (poměr součtu tloušťky interventrikulárního septa a inferolaterální stěny k rozměru levé komory na konci diastoly, Obr. 4.7.) a poměru vrcholové rychlosti časného průtoku mitrální chlopně a vrcholové rychlosti časného diastolického pohybu septálního okraje mitrálního anulu (E/Ea, Gandjbakhch E. et al., 2010).



Obr. 4.7.

Znázornění parametrů potřebných k výpočtu relativní tloušťky stěny. IVS - interventrikulární septum, PWT - tloušťka posterolaterální stěny, LVEDD - rozměr levé komory na konci diastoly.

	Genotyp + (n=7) Medián [IQR] nebo %	Genotyp - (n=10) Medián [IQR] nebo %	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
Rozeř 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]	<b>0,01</b>

Tab. 4.7.

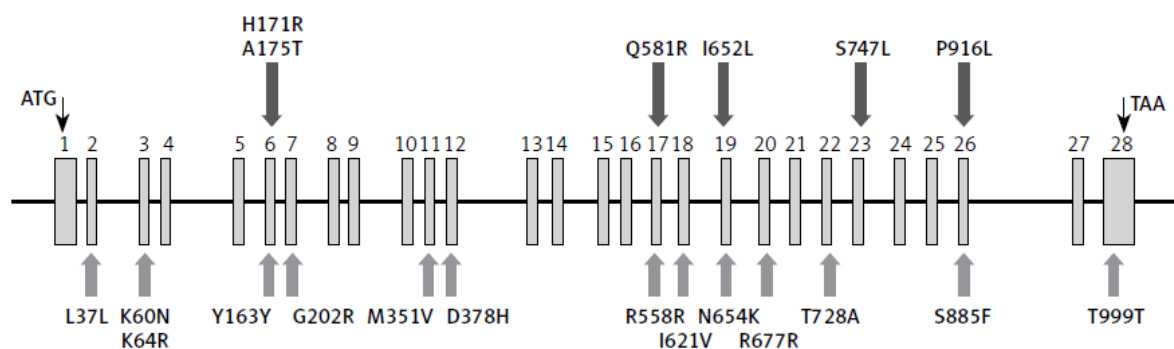
Porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi příbuznými s identifikovanou patogenní mutací (Genotyp +) a zbytkem souboru (Genotyp -). IVS - interventrikulární septum, PWT - tloušťka posterolaterální stěny, LVEDD - rozeř levé komory na konci diastoly, RWT - relativní tloušťka stěny, LVEF - 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, i když chybí průkaz v podobě jasné kosegregace genotypu a fenotypu v rodině našeho probanda. Několik dalších faktorů ale podporuje vztah genetické varianty p.H171R a vzniku HCM. Absence námi objevené varianty ve velkém kontrolním souboru bez známek kardiálního onemocnění je faktorem potvrzujícím patogenní úlohu dané varianty. Nesynonymní genetické varianty způsobující onemocnění se častěji nacházejí v evolučně konzervovaných oblastech genetického kódu. 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. Ke změně dochází v jednom z nebulin připomínajících modulů, kterých hlavní funkcí je vazba na aktin. Porušení této funkce genetickou variantou může být dostatečným mechanismem ke vzniku fenotypu HCM. 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. Exprese *NEBL* je navíc specifická pro srdeční sval, takže svým postavením a funkcí v kardiomyocytech představuje patofyziologicky vhodné místo k lokalizaci mutací způsobujících HCM. 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). V této práci autoři studovali efekt nalezených mutací na transgenním myším modelu se zvýšenou expresí lidského “wild-type” i mutantního *NEBL* omezeného na srdce. Zvířecí model ukazoval heterogenní fenotyp od letálních forem v embryonálním období až po fenotyp DCM s dilatací a dysfunkcí levé komory. Na buněčné úrovni docházelo ke změnám struktury Z-disků a I-proužků sarkomery a k abnormální distribuci mutantního nebulette v podmínkách mechanického napětí. Nebulette je tedy

nepostradatelný pro správnou organizaci a stabilizaci Z-disků sarkomery. Variabilita fenotypu při různých mutacích může být kromě jiného podmíněna i duální funkcí nebulette. Kromě poškození strukturální role může docházet i k poruchám očekávané regulační funkce při nitrobuněčném přenosu signálu (Ram R., Blaxall BC., 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

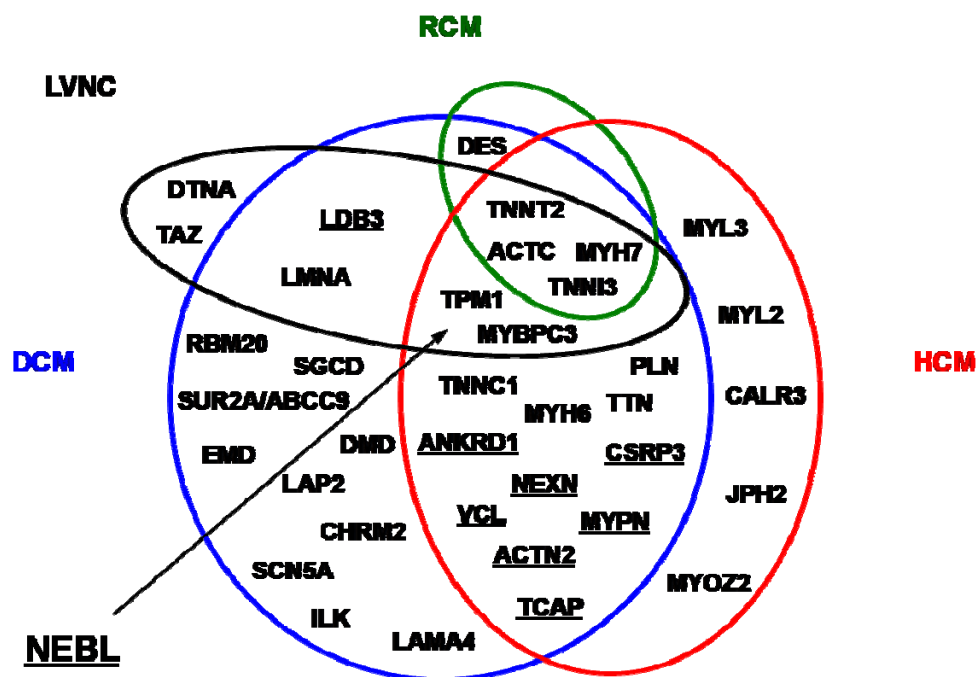


Obr. 5.1.

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

genetické polymorfizmy. Naproti tomu 5 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. Všechny identifikované varianty byly nesynonymní záměny jednoho nukleotidu a žádná z nich se nenacházela v kontrolní populaci 320 subjektů bez známek kardiálního onemocnění na echokardiografickém vyšetření a v kohortě 192 dárců krve. Dvě z variant (včetně p.H171R) se nenacházely v databázi dbSNP, ostatní byly přítomny s nízkou alelickou frekvencí 0,08 - 0,3 %. Čtyři z variant (včetně p.H171R) se nenacházely v databázi Exome Sequencing Project, zbylé dvě byly přítomny s velmi nízkou frekvencí pod 0,01 %. S výjimkou jedné varianty vedly ostatní k záměně aminokyselin s rozdílnými vlastnostmi.

Všechny varianty měly odhadovaný poškozující efekt na funkci proteinu v alespoň jednom z predikčních nástrojů (PolyPhen2 nebo Mutation Taster). S výjimkou jedné se všechny identifikované varianty nalézaly v některém z nebulinu podobných modulů, poslední varianta byla identifikována ve spojovací oblasti bohaté na serin. Porovnáním sekvence ortologů pro lidský gen *NEBL* se ukázalo, že všechny varianty sdílejí konzervovanost minimálně u savců, tři z nich (včetně p.H171R) i u dalších obratlovců. 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 polymorfizmy bez kauzálního vztahu ke vzniku onemocnění. Velmi nízká frekvence nebo úplná absence (jako v případě p.H171R) objevených variant v databázích dbSNP a Exome Sequencing Project je dalším pomocným kritériem jejich patogenicity. Nález mutací způsobujících různé typy familiárních kardiomyopatií v jednom genu je typický pro geny kódující proteiny Z-disků, ale i mnohé další proteiny sarkomery (Obr. 5.2.). Všechny geny pro proteiny Z-disků jsou asociovány minimálně s rozvojem dvou různých fenotypů, nejčastěji DCM i HCM. Vzhledem k roli Z-disků jako důležitých mechanoreceptorů a analyzátorů tažního napětí se při jejich genetické poruše jeví rozvoj fenotypu DCM jako logičtější důsledek než rozvoj hypertrofie. Specifické mechanismy vedoucí od konkrétní mutace k rozvoji fenotypu nejsou objasněny, v případě *NEBL* se opět může jednat o duální roli výsledného proteinu jak pro správnou strukturu Z-disků tak pro nitrobuňkový přenos signálu. Výsledný fenotyp je pravděpodobně sumou efektu mutace DNA, úprav proteinu, přítomnosti dalších genetických variant, epigenetických mechanismů a případně i vlivů prostředí. Prozatím ale postrádáme efektivní integrované nástroje k rozpoznání vlivu jednotlivých zmíněných složek na vznik konkrétního fenotypu. 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. Varianta p.H171R objevená u našeho pacienta ani další identifikované varianty nebyly vzhledem k rodinám s



Obr. 5.2.

Překryv genů asociovaných s různými formami familiárních kardiomyopatií. Geny pro proteiny Z-disků jsou podtrženy a jsou vždy asociovány s alespoň dvěma různými fenotypy. DTNA -  $\alpha$  dystrobrevin, TAZ - tafazzin, LDB3 – LIM vázající doména 3 (Cypher/ZASP), LMNA - lamin A/C, DES - dezmin, TNNT2 - srdeční troponin T, TNNI3 - srdeční troponin I, TNNC1 - srdeční troponin C, ACTC - srdeční  $\alpha$  aktin, MYH7 - těžký řetězec  $\beta$  myozinu, MYBPC3 - myozin vazebný protein C, TPM1 -  $\alpha$  tropomyozin, RBM20 - RNA vázoucí protein 20, SGCD -  $\delta$  sarkoglykan, SUR2A/ABCC9 - sulfonylureový receptor 2, EMD - emerín, DMD - dystrofin, LAP2 - protein vnitřní jaderné membrány, CHRM2 - acetylcholinový receptor 2, SCN5A -  $\alpha$  podjednotka napětím ovládaného sodíkového kanálu, ILK - s integrinem spojená kináza, LAMA4 -  $\alpha$ 4 laminin, PLN - fosfolamban, TTN - titin, MYH6 - těžký řetězec  $\alpha$  myozinu, ANKRD1 - ankyrin-repeat doména 3, CSRP3 - srdeční LIM protein, NEXN - nexilin, VCL - vinkulin, MYPN - myopalladin, ACTN2 -  $\alpha$ 2 aktinin, TCAP - teletonin, MYL3 – esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu, MYL2 - regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu, CALR3 - kalretikulin 3, JPH2 - junktofilin 2, MYOZZ - myozenin 2, NEBL - nebullette

nízkým počtem vyšetřených jedinců podrobeny vazbové analýze a rovněž nebyly provedeny funkční studie. 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

Genetické vyšetření pacientů s HCM se stává součástí každodenní praxe v péči o tyto nemocné. Zásadními faktory umožňujícími větší rozšíření genetického vyšetření těchto pacientů je klesající ekonomická náročnost a rozšíření vysokokapacitních metod NGS. Limitujícím faktorem klinické použitelnosti genetického vyšetření je nenalezení žádné mutace u značné části pacientů s HCM. Pouze v rodinách s identifikovanou patogenní mutací lze provádět genetické vyšetření příbuzných s vysokou spolehlivostí predikce rizika 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). Koncentrace genetického vyšetření na pacienty s familiární formou onemocnění je obecně dobré opatření ke zvýšení počtu identifikovaných variant. 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 (vyklenující se konvexním tvarem směrem do dutiny levé komory) byli nositeli mutace v sarkomerických genech v téměř 80 % případů, zatímco pacienti se septum sigmoideum (s konkávním povrchem interventrikulárního septa směrem do dutiny levé komory) 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 přiřadující 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. Hodnota 80 % nalezených mutací byla dosažena u pacientů se všemi rizikovými faktory, i když ve dříve zmíněné práci k tak velkému záchytu postačovala samotná reverzní morfologie interventrikulárního septa. 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. I když byli tito pacienti vyšetřeni na přítomnost mutací pouze ve 4 sarkomerických genech, šlo o geny, ve kterých se nachází největší množství mutací asociovaných s HCM a vynechání dalších sarkomerických genů v naší analýze by v celkové populaci pacientů nemělo představovat snížení zachycených mutací o více než 10 %. 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. Navzdory tomu, že některé mutace v sarkomerických genech jsou asociovány s penetrancí ve vyšším věku, celkově je u pacientů s mutacemi v sarkomerických genech přítomna hypertrofie levé komory v mladším věku než u neselektované skupiny nemocných. 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. Tito pacienti ale zcela splňují klinickou definici HCM od ESC a mají některé typické patofyziologické a klinické projevy HCM včetně srdečního selhání a obstrukce ve výtokovém traktu levé komory. Selektce 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 (reverzní morfologie interventrikulárního septa, věk pod 44 let, maximální hypertrofie levé komory nad 22 mm a rodinná anamnéza HCM) 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. Selektce 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 iniciační vyšetření pacientů se znaky asociovanými s mutacemi v těchto genech a s rezervováním nákladnějších modalit vyšetřujících mendeliom, celý exom nebo celý genom pro pacienty bez zmíněných fenotypových znaků se může ukázat jako ekonomicky výhodné. I přes velkou genetickou variabilitu HCM, jejíž projevy jsou množství mutací a genů asociovaných s touto nemocí a značná část pacientů bez nalezené genetické varianty v sarkomerických genech, je v případě HCM patrná dominantní role genů *MYH7* a *MYBPC3*. Tyto geny obsahují většinu identifikovaných mutací ve vyšetřovaných souborech. Stejně tak tomu bylo i v naší práci, i když jsme vyšetřovali pouze čtyři nejčastější geny. HCM se tak jeví geneticky homogennější než například familiární DCM s malými rozdíly v zastoupení jednotlivých genů asociovaných s touto nemocí (Haas J. et al., 2015).

### 5.3. Genetické a klinické vyšetření příbuzných pacientů s HCM

Hlavním klinickým využitím genetického vyšetření pacientů s HCM je řízení péče o jejich příbuzné. Existuje několik doporučení odborných společností týkajících se genetického vyšetření pacientů s HCM, včetně doporučených postupů pro diagnostiku a léčbu HCM od ESC a ACC/AHA a stanoviska ESC ke genetickému vyšetření pacientů s familiárními kardiomyopatiemi (Charron P. et al., 2010, Gersh BJ. et al., 2011, Elliott P. et al., 2014). Kromě omezených indikací při přítomnosti nezvyklých fenotypových rysů a při hraničních fenotypových nálezech je shodně ve všech doporučeních genetické vyšetření pacientů s HCM indikováno k nalezení patogenní mutace v rodině s cílem identifikace příbuzných s pozitivním genotypem. Vyšetření příbuzných na přítomnost známé mutace v rodině je poté velmi přesnou a efektivní metodou ovlivňující jejich další péči. Příbuzní s negativním genotypem nemusí být při absenci symptomů dále kardiologicky sledováni. V případě příbuzných s pozitivním genotypem bez vyvinutého fenotypu nemáme dostatek dlouhodobých dat o jejich prognóze, ale ta se zdá být dobrá. Existuje několik sdělení o výskytu náhlé smrti u příbuzných před rozvojem hypertrofie levé komory, které se téměř všechny týkají jedinců s mutacemi v genu pro srdeční troponin T (Moolman JC. et al., 1997, Pasquale F. et al., 2012). Zdá se ale logické jedince s pozitivním genotypem pravidelně sledovat a vyšetřovat analogicky k pacientům s rozvinutým fenotypem HCM včetně stratifikace rizika náhlé smrti. 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. Rozšíření genetického vyšetření pacientů s HCM zejména pomocí metod NGS vede k identifikaci velkého množství genetických variant, z nichž některé mají nejasný vztah ke vzniku onemocnění. Co nejpřesnější klasifikace identifikovaných variant stran jejich patogenicity umožní větší klinický přínos při vyšetřování příbuzných. V situaci, kdy genetické vyšetření nebylo provedeno anebo jím nebyla identifikována patogenní mutace v dané 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). Nejistota stran možného rozvoje dědičného onemocnění s sebou přináší i psychologickou zátěž. 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). Jedním z faktorů ovlivňujících rychlosti pohybu mitrálního prstence na tkáňovém dopplerovském zobrazení je věk vyšetřovaných jedinců, ale porovnání různých prací ukázalo velkou variabilitu tohoto parametru ve všech věkových skupinách. V naší práci zkoumající použitelnost echokardiografických k identifikaci příbuzných s pozitivním genotypem v české populaci byl věk jedinců podobný nebo vyšší v porovnání s ostatními studiemi. Samotné hodnoty rychlosti 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 na odhad jejích plnicích 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 interventrikulárního septa a posterolaterální stěny levé komory) a časné známky remodelace levé komory před rozvojem manifestní hypertrofie (poměr součtu tloušťky interventrikulárního septa a posterolaterální stěny k rozměru levé komory na konci diastoly – tedy relativní tloušťka stěny, Gandjbakhch E. et al., 2010). I na relativně malém vyšetřovaném souboru byl tento kombinovaný echokardiografický index dobrým nástrojem k identifikaci genotypu příbuzných, což potvrdily i naše výsledky na jedincích z české populace. Navržená diskriminační (cut-off) hodnota zmíněného indexu (0,45) s výbornou specificitou pro detekci příbuzných s pozitivním genotypem v původní práci ukazovala v našem souboru vysokou senzitivitu (100 %), ale pouze střední specificitu (60 %), což může naznačovat rozdílnou distribuci sledovaných parametrů v rozdílných populacích. Vysoce specifický nástroj k detekci jedinců s pozitivním genotypem by umožňoval určit příbuzné, kteří nepotřebují klinické sledování v krátkých intervalech, protože pravděpodobně nejsou nositeli patogenní mutace. Vysoká senzitivita by naopak umožnila selektovat příbuzné k sledování s větší frekvencí, případně k provedení rozšířeného spektra vyšetření, jako u pacientů s HCM. 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 právě 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, nebullete, 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 záhytu 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 dobrou 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 velkého 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.

## Literatura

1. Adabag AS, Casey SA, Kuskowski MA et al. Spectrum and prognostic significance of arrhythmias on ambulatory Holter electrocardiogram in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:697 – 704.
2. Adalsteinsdottir B, Teekakirikul P, Maron BJ et al. Nationwide study on hypertrophic cardiomyopathy in Iceland: evidence of a MYBPC3 founder mutation. *Circulation* 2014;130:158-67.
3. Alam M, Dokainish H, Lakkis NM. Hypertrophic obstructive cardiomyopathy-alcohol septal ablation vs. myectomy: a meta-analysis. *Eur Heart J* 2009;30:1080–1087.
4. Arimura T, Nakamura T, et al. Characterization of the human Nebulette gene: a polymorphism in an actin-binding motif is associated with nonfamilial idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hum Genet* 2000;107:440-451.
5. Axelsson A, Iversen K, Vejstrup 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.
6. Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, et al. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol* 2001;153:413-27.
7. Becker AE, Caruso G. Myocardial disarray. A critical review. *Br Heart J* 1982;47:527-38.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Cannon L, Yu ZY, Marciniak T et al. Irreversible triggers for hypertrophic cardiomyopathy are established in the early postnatal period. *J Am Coll Cardiol* 2015;65:560-9.
12. Codd MB, Sugrue DD, Gersh BJ et al. Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975–1984. *Circulation* 1989;80:564–572.
13. Coppini R, Ho CY, Ashley E et al. Clinical phenotype and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with thin-filament gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2589-600.
14. Corrado D, Basso C, Schiavon M et al. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in young athletes. *N Engl J Med* 1998;339:364–369.
15. 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.
16. Dimitrow PP, Bober M, Michalowska J et al. Left ventricular outflow tract gradient provoked by upright position or exercise in treated patients with hypertrophic cardiomyopathy without obstruction at rest. *Echocardiography* 2009;26:513 – 520.

17. Elliott P, Sharma S, Varnava A et al. Survival after cardiac arrest or sustained ventricular tachycardia in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:1596-1601.
18. 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.
19. Elliott P, Baker R, Pasquale F et al. Prevalence of Anderson-Fabry disease in patients with hypertrophic cardiomyopathy: the European Anderson-Fabry Disease survey. *Heart* 2011;97:1957-1960.
20. 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.
21. Esham M, Bryan K, Milnes J et al. Expression of nebulin during early cardiac development. *Cell Motil Cytoskeleton* 2007;64: 258-73.
22. Filla A, De Michele G, Cavalcanti F et al. The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am J Hum Genet* 1996;59:554-560.
23. Fujiwara H, Kawai C, Hamashima Y. Myocardial fascicle and fiber disarray in 25  $\mu$ -thick sections. *Circulation* 1979;59:1293-8.
24. 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.
25. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G et al. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell* 1990;62:999-1006.
26. 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.
27. Green JJ, Berger JS, Kramer CM et al. Prognostic value of late gadolinium enhancement in clinical outcomes for hypertrophic cardiomyopathy. *JACC Cardiovasc Imaging* 2012;5:370 – 377.
28. 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.
29. Guttman OP, Rahman MS, O'Mahony C et al. Atrial fibrillation and thromboembolism in patients with hypertrophic cardiomyopathy: systematic review. *Heart* 2014;100:465-72.
30. 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.
31. Hada Y, Sakamoto T, Amano K et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population of adult Japanese workers as detected by echocardiographic screening. *Am J Cardiol* 1987;59:183-184.
32. Harrigan CJ, Appelbaum E, Maron BJ et al. Significance of papillary muscle abnormalities identified by cardiovascular magnetic resonance in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2008;101:668-73.
33. Haas J, Frese KS, Peil B et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2015;36:1123-35a.
34. Hayashi H, Hayashi M, Miyauchi Y et al. Left atrial wall thickness and outcomes of catheter ablation for atrial fibrillation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Interv Card Electrophysiol* 2014;40:153-60.



35. Hiramitsu S, Morimoto S, Kato S et al. Transient ventricular wall thickening in acute myocarditis: a serial echocardiographic and histopathologic study. *Jpn Circ J* 2001;65:863–866.
36. 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.
37. 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.
38. Holmes WB, Moncman CL. Nebulette interacts with filamin C. *Cell Motil Cytoskeleton* 2008; 65: 130-42.
39. Hradec J, Marek J, Petrsek J. The nature of cardiac hypertrophy in acromegaly: an echocardiographic study. *Cor Vasa* 1988;30:186 – 199.
40. Huddle KR, Kalliatakis B, Skoularigis J. Pheochromocytoma associated with clinical and echocardiographic features simulating hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Chest* 1996;109:1394 – 1397.
41. Chang AN, Greenfield NJ, Singh A et al.. Structural and protein interaction effects of hypertrophic and dilated cardiomyopathic mutations in alpha-tropomyosin. *Front Physiol* 2014;5:460.
42. Charron P, Dubourg O, Desnos M et al. Diagnostic value of electrocardiography and echocardiography for familial hypertrophic cardiomyopathy in a genotyped adult population. *Circulation* 1997;96:214–219.
43. Charron P, Villard E, Sebillon P et al. Danon’s disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart* 2004;90:842–846.
44. 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.
45. Jahnlová D, Tomašov P, Zemánek D, Veselka J. Transatlantic differences in assessment of risk of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2015;186:3-4.
46. Jarcho JA, McKenna W, Pare JA et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 1989;321:1372-8.
47. Jarzembowski TM, John E, Panaro F et al. Reversal of tacrolimus-related hypertrophic obstructive cardiomyopathy 5 years after kidney transplant in a 6-year-old recipient. *Pediatr Transplant* 2005;9:117–121.
48. Judge DP, Neamatalla H, Norris RA et al. Targeted Mybpc3 Knock-Out Mice with Cardiac Hypertrophy Exhibit Structural Mitral Valve Abnormalities. *J Cardiovasc Dev Dis* 2015;2:48-65.
49. Kato TS, Takayama H, Yoshizawa S et al. Cardiac transplantation in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2012;110:568–574.
50. Kim LK, Swaminathan RV, Looser P et al. Hospital volume outcomes after septal myectomy and alcohol septal ablation for treatment of obstructive hypertrophic cardiomyopathy. US nationwide inpatient database, 2003-2011. *JAMA Cardiol* 2016;Epub ahead of print.
51. Kitaoka H, Doi Y, Casey SA et al. Comparison of prevalence of apical hypertrophic cardiomyopathy in Japan and the United States. *Am J Cardiol* 2003;92:1183-6.

52. Kitaoka H, Kubo T, Okawa M et al. Tissue doppler imaging and plasma BNP levels to assess the prognosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Soc Echocardiogr* 2011;24:1020 – 1025.
53. Klues HG, Roberts WC, Maron BJ. Anomalous insertion of papillary muscle directly into anterior mitral leaflet in hypertrophic cardiomyopathy. Significance in producing left ventricular outflow obstruction. *Circulation* 1991;84:1188 – 1197.
54. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1440–1463.
55. Limongelli G, Masarone D, D'Alessandro R, Elliott PM. Mitochondrial diseases and the heart: an overview of molecular basis, diagnosis, treatment and clinical course. *Future Cardiol* 2012;8:71 – 88.
56. Limongelli G, D'Alessandro R, Maddaloni V et al. Skeletal muscle involvement in cardiomyopathies. *J Cardiovasc Med* 2013;14:837 – 861.
57. Lin AE, Grossfeld PD, Hamilton RM et al. Further delineation of cardiac abnormalities in Costello syndrome. *Am J Med Genet* 2002;111:115 – 129.
58. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature* 2014;508:469-76.
59. Marian AJ, Roberts R. Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J* 1994;21:6-15.
60. 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.
61. Marketou ME, Parthenakis FI, Kalyva A et al. Circulating mesenchymal stem cells in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiovasc Pathol* 2015;24:149-53.
62. Maro EE, Janabi M, Kaushik R. Clinical and echocardiographic study of hypertrophic cardiomyopathy in Tanzania. *Trop Doct* 2006;36:225–227.
63. Maron BJ, Anan TJ, Roberts WC. Quantitative analysis of the distribution of cardiac muscle cell disorganization in the left ventricular wall of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 1981;63:882-94.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Maron BJ, Maron MS. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet* 2013;381:242-55.
68. Maron MS, Olivotto I, Betocchi S et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003;348:295–303.

69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. McCully RB, Nishimura RA, Tajik AJ et al. Extent of clinical improvement after surgical treatment of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Circulation* 1996;94:467–471.
73. McElhinny AS, Schwach C, Valicnac M et al. Nebulin regulates the assembly and lengths of the thin filaments in striated muscle. *J Cell Biol* 2005;170:947-57.
74. McKenna WJ, Oakley CM, Krikler DM et al. Improved survival with amiodarone in patients with hypertrophic cardiomyopathy and ventricular tachycardia. *Br Heart J* 1985;53:412–416.
75. McLeod CJ, Ackerman MJ, Nishimura RA et al. Outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy and a normal electrocardiogram. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:229–233.
76. Melacini P, Maron BJ, Bobbo F et al. Evidence that pharmacological strategies lack efficacy for the prevention of sudden death in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* 2007;93:708–710.
77. Melacini P, Basso C, Angelini A et al. Clinicopathological profiles of progressive heart failure in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2010;31:2111–2123.
78. 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.
79. Moncman CL, Wang K. Nebulette: A 107 kD Nebulin-Like Protein in Cardiac Muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 1995;32:205-225.
80. Moncman CL, Wang K. Functional dissection of nebulette demonstrates actin binding of nebulin-like repeats and Z-line targeting of SH3 and linker domains. *Cell Motil Cytoskeleton* 1999;44:1-22.
81. 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.
82. Moolman JC, Corfield VA, Posen B et al. Sudden death due to troponin T mutations. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:549–555.
83. 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.
84. 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.
85. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
86. Murphy RT, Mogensen J, McGarry K et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase disease mimicks hypertrophic cardiomyopathy and Wolff-Parkinson-White syndrome: natural history. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:922–930

87. Nagata Y, Konno T, Fujino N et al. Right ventricular hypertrophy is associated with cardiovascular events in hypertrophic cardiomyopathy: evidence from study with magnetic resonance imaging. *Can J Cardiol* 2015;31:702-8.
88. Nagueh SF, Groves BM, Schwartz L et al. Alcohol septal ablation for the treatment of hypertrophic obstructive cardiomyopathy: a Multicenter North American registry. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2322-2328.
89. Nicod P, Polikar R, Peterson KL. Hypertrophic cardiomyopathy and sudden death. *N Engl J Med* 1988;318:1255–1257.
90. Nistri S, Thiene G, Basso C et al. Screening for hypertrophic cardiomyopathy in a young male military population. *Am J Cardiol* 2003; 91:1021–1023.
91. Nistri S, Olivotto I, Betocchi S et al. Prognostic significance of left atrial size in patients with hypertrophic cardiomyopathy (from the Italian Registry for Hypertrophic Cardiomyopathy). *Am J Cardiol* 2006;98:960–965.
92. Ogut O, Hossain MM, et al. Interactions between nebulin-like motifs and thin filament regulatory proteins. *J Biol Chem* 2003;278:3089-3087.
93. O’Hanlon R, Assomull RG, Prasad SK. Use of cardiovascular magnetic resonance for diagnosis and management in hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep* 2007;9:51–56.
94. Ommen SR, Maron BJ, Olivotto I et al. Long-term effect of surgical myectomy on survival in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:470–476.
95. Ong KC, Geske JB, Hebl VB et al. Pulmonary hypertension is associated with worse survival in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2016;17:604-10.
96. Qintar M, Morad A, Alhawasli H et al.. Pacing for drug-refractory or drug-intolerant hypertrophic cardiomyopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;5:CD008523.
97. Pasquale F, Syrris P, Kaski JP et al.. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:10-17.
98. 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.
99. Perrot A, Tomasov P, Villard E et al. Mutations in NEBL encoding the cardiac Z-disk protein nebulin are associated with various cardiomyopathies. *Arch Med Sci* 2016;12:263-78.
100. Prasad K, Williams L, Campbell R et al. Episodic syncope in hypertrophic cardiomyopathy: evidence for inappropriate vasodilation. *Heart* 2008;94:1312–1317.
101. 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.
102. Pyle WG, Solaro RJ. At the Crossroads of Myocardial Signaling. The Role of Z-Discs in Intracellular Signaling and Cardiac Function. *Circ Res* 2004;94:296-305.
103. Ram R, Blaxall BC. Nebulette mutations in cardiac remodeling: big effects from a small mechanosensor. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:1503-5.
104. Rangel I, Gonçalves A, de Sousa C et al. Spirito-Marón echocardiographic score: a marker for morphological and physiological assessment of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Echocardiography* 2014;31:708-15.

105. Rapezzi C, Quarta CC, Guidalotti PL et al. Usefulness and limitations of <sup>99m</sup>Tc-3,3-diphosphono-1,2-propanodicarboxylic acid scintigraphy in the aetiological diagnosis of amyloidotic cardiomyopathy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011;38:470-8.
106. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio AL et al. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J* 2013;34:1448–1458
107. Rickers C, Wilke NM, Jerosch-Herold M et al. Utility of cardiac magnetic resonance imaging in the diagnosis of hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2005;112:855–861.
108. Riedlbauchová L, Janoušek J, Veselka J. Ablation of hypertrophic septum using radiofrequency energy: an alternative for gradient reduction in patient with hypertrophic obstructive cardiomyopathy? *J Invasive Cardiol* 2013;25:E128-32.
109. Rogers DP, Marazia S, Chow AW et al. Effect of biventricular pacing on symptoms and cardiac remodelling in patients with end-stage hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2008;10:507–13.
110. Rudolph A, Abdel-Aty H, Bohl S et al. Noninvasive detection of fibrosis applying contrast-enhanced cardiac magnetic resonance in different forms of left ventricular hypertrophy relation to remodeling. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:284–291.
111. 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.
112. Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. Leopard syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2008;3:13.
113. Schaff HV, Dearani JA, Ommen SR et al. Expanding the indications for septal myectomy in patients with hypertrophic cardiomyopathy: results of operation in patients with latent obstruction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;143:303–309.
114. Sigwart U. Non-surgical myocardial reduction for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet* 1995;346:211-4.
115. Sorajja P, Ommen SR, Nishimura RA et al. Adverse prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy who have epicardial coronary artery disease. *Circulation* 2003;108:2342-8.
116. Sorajja P, Nishimura RA, Gersh BJ et al. Outcome of mildly symptomatic or asymptomatic obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:234–241.
117. Spacek M, Fiedler J, Suchanek V et al. Echocardiographic detection of myocardial crypts in hypertrophic cardiomyopathy: a first report in phenotype-positive patient. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2014;15:1180.
118. Teare D. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J* 1958;20:1–8.
119. Ullmo S, Vial Y, Di Bernardo S et al. Pathologic ventricular hypertrophy in the offspring of diabetic mothers: a retrospective study. *Eur Heart J* 2007;28:1319–1325.
120. Urbano-Moral JA, Rowin EJ, Maron MS et al. Investigation of global and regional myocardial mechanics with 3-dimensional speckle tracking echocardiography and relations to hypertrophy and fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Imaging* 2014;7:11–19.
121. Van Driest SL, Ackerman MJ, Ommen SR, et al. Prevalence and severity of “benign” mutations in the beta-myosin heavy chain, cardiac troponin T, and alpha-tropomyosin genes in hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2002;106:3085–90.
122. Veselka J, Duchonová R, Procházková S et al. Effects of varying ethanol dosing in percutaneous septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy on early hemodynamic changes. *Am J Cardiol* 2005;95:675-8.

123. Veselka J, Krejci J, Tomasov P et al. Long-Term Survival after Alcohol Septal Ablation for Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy: A Comparison with General Population. *Eur Heart J* 2014;35:2040-5.
124. Veselka J, Jensen MK, Liebrechts 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.
125. Watkins H, Rosenzweig A, Hwang DS, et al. Characteristics and prognostic implications of myosin missense mutations in familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1992;326:1108–14.
126. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and (alpha)-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995;332:1058–65.
127. Wigle ED, Sasson Z, Henderson MA et al. Hypertrophic cardiomyopathy. The importance of the site and the extent of hypertrophy. A review. *Prog Cardiovasc Dis* 1985;28:1–83.
128. Wilkinson JD, Lowe AM, Salbert BA et al. Outcomes in children with Noonan syndrome and hypertrophic cardiomyopathy: a study from the Pediatric Cardiomyopathy Registry. *Am Heart J* 2012;164:442–448.
129. Yingchoncharoen T, Tang WW. Recent advances in hypertrophic cardiomyopathy. *F1000Prime Rep* 2014;6:12.
130. Zemanek D, Svab P, Veselka J. Power Doppler myocardial contrast echocardiography in alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 2010;33:E82.
131. Zou Y, Song L, Wang Z et al. Prevalence of idiopathic hypertrophic cardiomyopathy in China: a population-based echocardiographic analysis of 8080 adults. *Am J Med* 2004;116:14–18.