

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: Preventivní medicína



**MUDr. Jiří Bonaventura**

Genetické vyšetření u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií

Genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Josef Veselka, CSc., FESC, FSCAI, FICA

Praha, 2020

**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, 5.9.2020

Jiří Bonaventura

Podpis

## Identifikační záznam

BONAVENTURA, Jiří. *Genetické vyšetření u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. [Genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy]*. Praha, 2020. 88 stran. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Kardiologická klinika 2. LF UK a FN Motol. Školitel Veselka, Josef.

## **Poděkování**

Děkuji panu profesoru Veselkovi za odborné rady a vedení při provádění vědeckého projektu a přípravě disertační práce.

Poděkování patří kolegům a spoluautorům z Kardiologické kliniky 2. LF UK a FN Motol a z Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol za spolupráci na projektu.

Děkuji panu doktoru Malému za odbornou pomoc při statistické analýze dat.

V Praze, dne 5.9.2020

Jiří Bonaventura

## Obsah

1	Úvod.....	6
1.1	Definice .....	6
1.2	Epidemiologie.....	6
1.3	Dědičnost .....	6
1.4	Fenotyp a klinická diagnostika .....	7
1.5	Genotyp .....	12
1.6	Vztah fenotypu a genotypu.....	15
1.7	Sekvenování nové generace.....	17
1.8	Klasifikace genetických variant.....	18
1.9	Genetický screening .....	19
1.10	Diagnostická výtěžnost molekulárně genetického vyšetření .....	22
2	Cíle práce.....	25
2.1	Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice .....	25
2.2	Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem.....	25
2.3	Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření.....	26
2.4	Kaskádovité vyšetřování příbuzných.....	26
2.5	Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace.....	26
3	Metody .....	27
3.1	Soubor pacientů .....	27
3.2	Molekulárně genetické vyšetření .....	28
3.3	Statistická analýza .....	29
4	Výsledky.....	31
4.1	Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice .....	31
4.2	Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem.....	55
4.3	Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření .....	56
4.4	Kaskádovité vyšetřování příbuzných.....	58
4.5	Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace.....	60
5	Diskuse .....	67
5.1	Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice .....	67
5.2	Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem.....	68
5.3	Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření .....	70
5.4	Kaskádovité vyšetřování příbuzných.....	73
5.5	Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace.....	74
6	Závěr.....	77
7	Seznam použité literatury .....	78

# 1 Úvod

## 1.1 Definice

Hypertrofická kardiomyopatie (HCM) je dědičné onemocnění, definované nadměrným zesílením stěn levé komory (LK) srdeční při nepřítomnosti hemodynamické příčiny, která by k dané hypertrofii LK mohla vést (Elliott *et al.*, 2014; Veselka, Anavekar a Charron, 2017). Mezi klinicky nejčastější takto vylučované hemodynamické příčiny patří arteriální hypertenze, aortální stenóza, koarktace aorty a tzv. sportovní srdce.

## 1.2 Epidemiologie

S předpokládanou prevalencí 1/500 až 1/200 obyvatel se jedná o jednu z vůbec nejčastějších hereditárních srdečních chorob (Maron *et al.*, 2009; Semsarian *et al.*, 2015). HCM je také pravděpodobně nejčastější příčina náhlé srdeční smrti u dětí školního věku (Colan *et al.*, 2007; Östman-Smith *et al.*, 2008) a mladých sportovců (Maron *et al.*, 2009), kteří si onemocnění často nejsou vědomi.

## 1.3 Dědičnost

Ve většině případů (tj. u mutací genů pro sarkomerické proteiny) je popisována autosomálně dominantní (AD) dědičnost (Richard *et al.*, 2003). Typická je neúplná penetrance a variabilní expresivita. Penetrance se pohybuje okolo 70 % a je závislá na věku (Charron *et al.*, 1997; Michels *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2013). Do 30 let věku se penetrantní genotyp projeví u přibližně 55 % jedinců, po 50. roce věku u více než 95 %, častěji u mužů (Charron *et al.*, 1997; Michels *et al.*, 2009).

Kromě tzv. klasické formy HCM podmíněné mutacemi v genech pro sarkomerické proteiny se vzácněji vyskytuje HCM v rámci systémových dědičných onemocnění a syndromů.

Dědičnost může být v těchto případech kromě AD i autosomálně recesivní a X-vázaná (Tab. 1).

**Tab. 1.** Hypertrofická kardiomyopatie a syndromy. (Bonaventura et al. 2020)

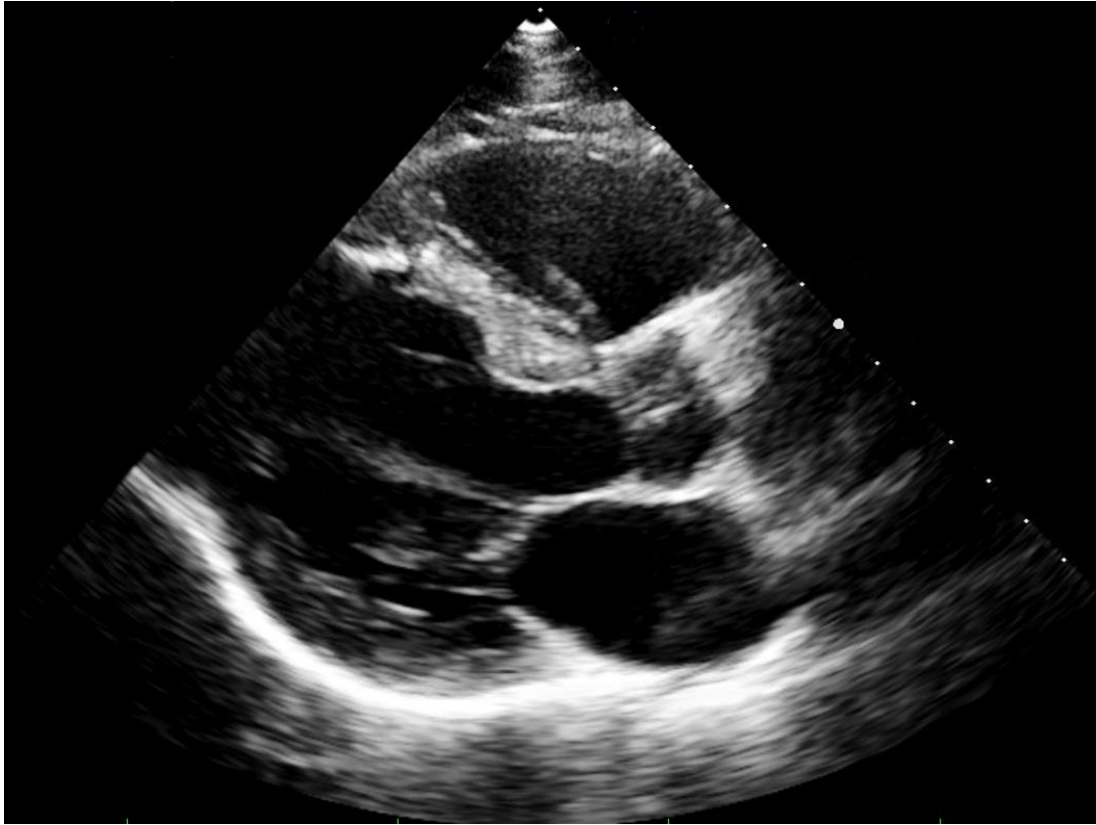
Originální název genového produktu	Gen	Asociovaná diagnóza	Dědičnost
Gama-regulační podjednotka AMP-aktivované protein kinázy	PRKAG2	Wolff-Parkinson-White syndrom	AD
Lyzosomální membránový protein 2	LAMP2	Danonova choroba	X-vázaná
Alfa-galaktosidáza A	GLA	Fabryho choroba	X-vázaná
Transtyretin	TTR	Amyloidóza	AD
Alfa-glukosidáza	GAA	Pompeho choroba	AR
Protein tyrosinová fosfatáza, typ 11	PTPN11	Syndrom Noonanové, LEOPARD syndrom	AD
Frataxin	FXN	Friedreichova ataxie	AR
Four and half LIM doména 1	FHL1	Emery-Dreifussova myopatie	X-vázaná

#### 1.4 Fenotyp a klinická diagnostika

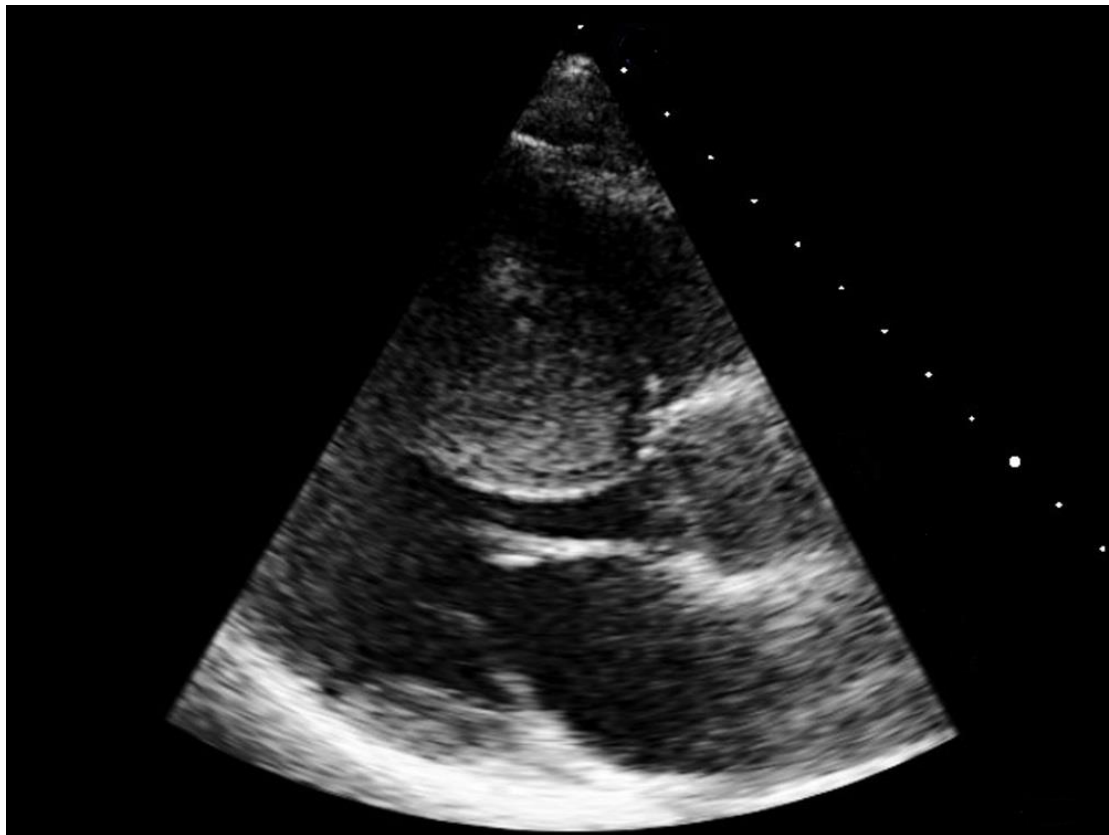
Nejvýraznější fenotypovou charakteristikou HCM je hypertrofie LK. Základním diagnostickým kritériem je tloušťka srdeční svaloviny  $\geq 15$  mm zjištěná zobrazovacím vyšetřením (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014). Pro diagnózu HCM stačí průkaz hypertrofie v jakémkoli segmentu srdeční komory, asymetrická septální hypertrofie je však častější než koncentrická hypertrofie LK. Nejčastější je postižení bazálních a středních anteroseptálních segmentů. Rozsah hypertrofie je velmi variabilní a je spojen s rizikem náhlé srdeční smrti (Veselka, Anavekar and Charron, 2017).

Podle tvaru interventrikulárního septa (IVS) a dutiny LK lze morfologii postižení rozdělit do čtyř kategorií (Binder *et al.*, 2006):

- i) septum sigmoideum s konkávní plochou IVS směrem do dutiny levé komory (Obr. 1)
- ii) reverzní septum, které se klene do dutiny LK konvexní plochou (Obr. 2)
- iii) neutrální septum bez výrazně konvexní či konkávní plochy (Obr. 3)
- iv) apikální forma HCM (Obr. 4)



**Obr. 1. Septum sigmoideum** (Echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu)

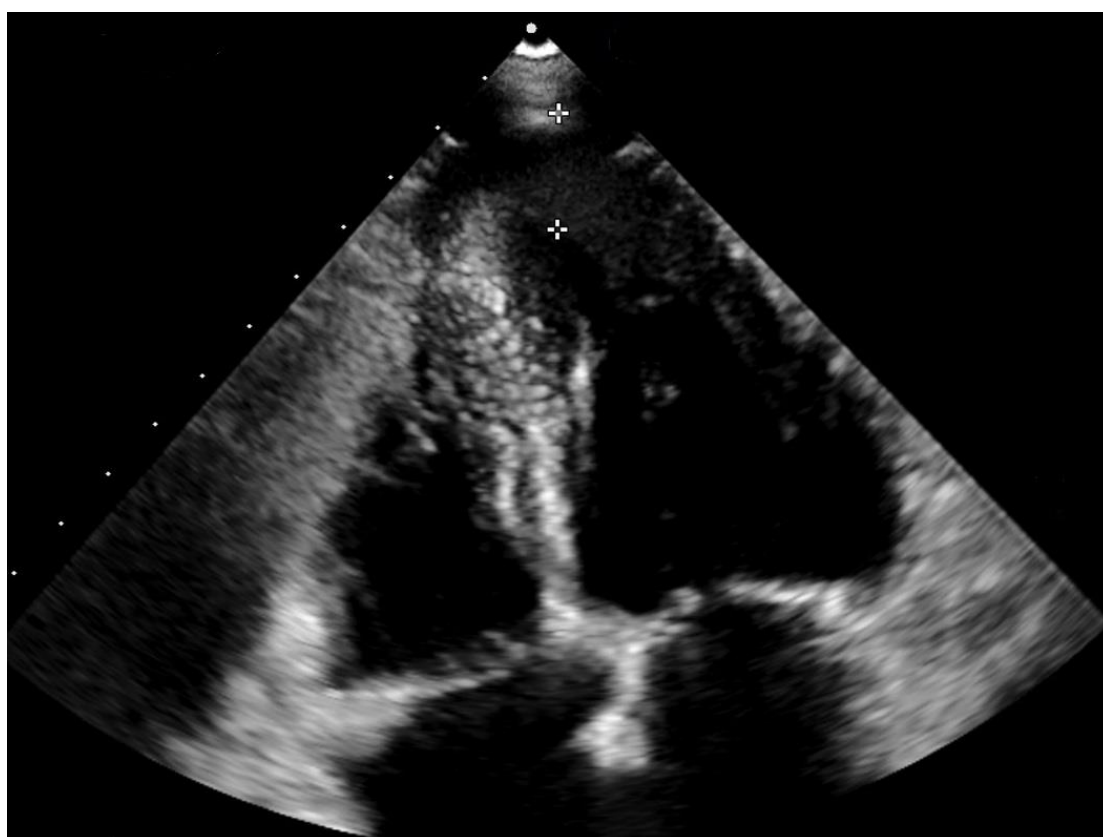


**Obr. 2. Reverzní septum** (Echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu)





**Obr. 3. Neutrální septum** (Echokardiografické vyšetření, parasternální projekce na dlouhou osu)



**Obr. 4 Apikální forma HCM** (Echokardiografické vyšetření, apikální čtyřdutinová projekce)

V klinické praxi používáme k diagnostice HCM nejčastěji echokardiografické vyšetření, které je levné a snadno dostupné. U prvostupňových příbuzných pacienta s již diagnostikovanou HCM jsou kritéria přísnější; k diagnóze stačí po vyloučení hemodynamických příčin tloušťka jakéhokoli segmentu stěny LK  $\geq 13$  mm (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014).

V diagnostice pacientů s HCM má stále větší uplatnění magnetická rezonance (MRI) srdce. Dokáže přesně zhodnotit přítomnost, rozsah a tíži hypertrofie myokardu, zejména při nedostatečné echokardiografické vyšetřitelnosti. Je užitečná v diagnostice méně obvyklých forem HCM, které mohou být obtížně diagnostikovatelné echokardiograficky, např. apikální formy HCM. Oproti echokardiografii je dále citlivější v diagnostice hrotových aneurysmat, jež se vyskytují asi u 2 % nemocných. Velmi užitečná je při MRI možnost tkáňové charakteristiky pomocí kontrastního vyšetření s gadoliniem, kdy pozdní syčení myokardu kontrastní látkou (tzv. late gadolinium enhancement – LGE) souvisí s rozsahem intersticiálního prostoru a je typické pro přítomnost fibrózy. Ukazuje se, že rozsah LGE u pacientů s HCM je asociován se zvýšeným rizikem náhlé smrti (Nagueh *et al.*, 2011; Mentias *et al.*, 2018; Freitas *et al.*, 2019).

Ačkoli jsou základem diagnostiky HCM výše uvedené zobrazovací metody, podezření může vzniknout již na základě fyzikálního a elektrokardiografického (EKG) vyšetření. Fyzikální vyšetření nicméně může být u pacienta s HCM zcela normální a je pravděpodobně jednou z příčin poddiagnostikování HCM v primární péči při předpokládané relativně vysoké prevalenci onemocnění. U části pacientů může být palpačně patrný zvedavý úder hrotu srdce podmíněný hypertrofií LK. Klasickým poslechovým nálezem odrážejícím přítomnost dynamické obstrukce ve výtokovém traktu levé komory (LVOT) je crescendo-decrescendový systolický šelest, slyšitelný s maximem vlevo od sternu. Na rozdíl od aortální stenózy se tento šelest obvykle nepropaguje do karotid. Intenzitu šelestu lze zvýraznit manévry, kterými snižujeme náplň LK – nejčastěji Valsalvův manévr či rychlá změna polohy z dřepu do stoje. Kromě tohoto typického šelestu může být patrný systolický šelest s maximem na srdečním hrotu, související s mitrální regurgitací (Štěchovský, Adla a Bonaventura, 2019).

Asi u 5 % pacientů s HCM je EKG křivka normální, nicméně u naprosté většiny nemocných je EKG patologické (Ryan *et al.*, 1995). Tohoto faktu se využívá při screeningovém vyšetření. Voltážové známky hypertrofie LK se vyskytují u více než 75 % pacientů. Jsou často doprovázené výraznými inverzemi vln T, zvláště vyjádřenými u apikální formy HCM. Patologické kmity Q, imitující stav po infarktu myokardu, se mohou objevit v jakémkoli svodu a jejich pravděpodobným podkladem je abnormální aktivace komorového septa. Častá

je absence pozitivních kmitů R nebo porucha jejich gradientu v hrudních svodech. Mohou být přítomny poruchy nitrokomorového vedení (blokády Tawarových ramének, levý přední hemiblok). Holterovské monitorování EKG prokazuje u pacientů s HCM vysokou incidenci supraventrikulárních tachykardií, komorových extrasystol i prognosticky závažných nesetrválých komorových tachykardií (Štěchovský, Adla a Bonaventura, 2019).

Patofyziologie HCM je komplexní a zahrnuje diastolickou dysfunkci, myokardiální ischemii, obstrukci LVOT, mitrální regurgitaci, supraventrikulární i komorové arytmie. Porucha diastolické funkce LK je patrná u většiny nemocných s HCM již v časně fázi onemocnění. S progresí diastolické dysfunkce, související s rozvojem intersticiální fibrózy a nárůstem rigidity myokardu, dochází ke zvyšování tlaku v levé síni (LS) a postkapilární plicní hypertenzi. Zvyšování tlaku v LS a její dilatace má za následek rozvoj supraventrikulárních arytmií, nejčastěji fibrilace síní. Ischemie myokardu u HCM vzniká v důsledku hypertrofie myokardu a mikrovaskulární dysfunkce spojené s redukcí sítě kapilár (Veselka, Anavekar a Charron, 2017; Štěchovský, Adla a Bonaventura, 2019).

Obstrukce LVOT je při HCM dynamická a mění se podle náplně komor a kontraktility. U třetiny HCM pacientů je přítomna v klidu, u další třetiny pacientů je přítomna jen po provokaci (tzv. latentní obstrukce). Jak klidová, tak provokovaná obstrukce má řadu nepříznivých důsledků. Zvýšením afterloadu (dotížení) stoupá tlak v LK, což podporuje jak ischemii myokardu, tak zhoršení diastolické funkce, a je též podkladem mitrální regurgitace, která dále posupně zvyšuje tlak v LS. Při těžší obstrukci dochází k redukcí srdečního výdeje. Podkladem obstrukce LVOT je dopředný pohyb jednoho či obou cípů mitrální chlopně během systoly, tzv. SAM (systolic anterior motion) směrem k hypertrofickému IVS (zejména jeho basální části). Důsledek je dynamické zúžení LVOT. Mezi faktory podporující vznik SAM patří hemodynamické síly (akcelerace proudění krve kolem basálního IVS „nasávající“ mitrální cípy do LVOT) a komplexní abnormalita celého aparátu mitrální chlopně.

Charakteristický pro HCM je dopředný a apikální posun papilárních svalů a elongace cípů mitrální chlopně, zejména předního. Někteří pacienti s HCM mají obstrukci midventrikulárně, nejčastěji v důsledku hypertrofie papilárních svalů nebo abnormální inzerce papilárního svalu přímo na přední cíp mitrální chlopně. Obstrukce LVOT je spojena s vyšší rizikem náhlé srdeční smrti a lze ji efektivně léčit septální redukční terapií. Alkoholová septální ablace účinně zlepšuje obstrukci LVOT i symptomatologii pacientů a je považována za bezpečný výkon za předpokladu provedení v expertních centrech (Veselka, *et al.*, 2016; Štěchovský,

Adla a Bonaventura, 2019; Veselka *et al.*, 2019). Méně indikovanou alternativou v ČR je chirurgická myektomie.

Na rozdíl od závažné diastolické poruchy, systolická funkce LK je u většiny pacientů s HCM zachovalá, obvykle supranormální. U malé části pacientů (3-5 %) dochází v průběhu života k postupné remodelaci LK, její dilataci a výraznému snížení ejekční frakce LK. Tento stav se nazývá tzv. burnout (nebo „end-stage“) fáze HCM a je spojen s nepříznivou prognózou, tj. nutností transplantace srdce nebo časným úmrtím (Biagini *et al.*, 2005; Harris *et al.*, 2006). K transplantaci srdce však může vzácněji vést i těžké srdeční selhání se zachovalou ejekční frakcí LK (Rowin *et al.*, 2014; Wells *et al.*, 2018).

Endomyokardiální biopsie nemá v diagnostice HCM významné postavení. Je zatížena nezanedbatelným množstvím možných komplikací a obvykle nepřináší u dospělých HCM pacientů žádnou novou klinicky významnou informaci pro diagnózu ani terapii (Štěchovský, Adla a Bonaventura, 2019). Výjimkou mohou být HCM při metabolických či strádavých onemocněních, ale i zde v současnosti upřednostňujeme neinvazivní metody (Bonaventura *et al.* 2020)

K rozvoji fenotypu HCM může dojít díky nekompletní penetranci a variabilní expresivitě kdykoli během života, většina se však manifestuje do 50. roku věku. Převážná část pacientů má mírné symptomy a diagnóza HCM je učiněna „náhodně“ např. při preventivní prohlídce nebo v rámci familiárního screeningu.

Zásadními diagnostickými prostředky tedy jsou:

- i) pečlivý odběr rodinné a osobní anamnézy
- ii) fyzikální vyšetření
- iii) EKG vyšetření
- iv) echokardiografické vyšetření
- v) MRI srdce a Holter EKG k rizikové stratifikaci

## 1.5 Genotyp

Současná definice Evropské kardiologické společnosti (ESC) rozlišuje mezi kardiomyopatiemi vedle tzv. klasické formy HCM podmíněné mutacemi v genech pro sarkomerické proteiny i vzácněji se vyskytující kardiomyopatie v rámci systémových onemocnění. Tato onemocnění, dříve označovaná jako tzv. fenokopie, se dle ESC guidelines

2014 řadí do skupiny HCM (Elliott *et al.*, 2014). Mezi ně patří glykogenózy (např. Pompeho či Danonova choroba), lyzosomální strádavá onemocnění (např. Fabryho choroba), mitochondriální poruchy, neuromuskulární onemocnění (Friedreichova ataxie, Emery-Dreifussova myopatie) a tzv. syndromické HCM (např. syndrom Noonanové, LEOPARD, PRKAG2) (Tab. 1).

V klinické praxi je velmi obtížné odlišit pomocí neinvazivních zobrazovacích metod skutečnou hypertrofii kardiomyocytů od zesílení stěn podmíněného intersticiální infiltrací či akumulací metabolických substrátů. Proto současná definice Evropské kardiologické společnosti nepovažuje přítomnost akumulace patologického substrátu za vylučující kritérium diagnózy HCM (Elliott *et al.*, 2014).

Genetickými studii z 80. a 90. let minulého století byly objeveny varianty v genech kódujících proteiny sarkomery asociované s těžkou hypertrofií LK. V roce 1990 byla popsána první mutace v genu pro těžký řetězec beta-myosinu (*MYH7*) zodpovědná za vznik HCM (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990). Během následující dekády pak byly postupně reportovány další geny asociované se vznikem HCM (Ho *et al.*, 2015). Jejich stručný přehled je uveden v Tab. 2.

**Tab. 2.** Geny asociované s HCM. (Bonaventura, Veselka 2019)

	<b>Gen</b>	<b>Lokus</b>	<b>Výskyt (%)</b>
<b>Frekventní sarkomerické geny</b>			
<b>Tlustá myofilamenta</b>			
Těžký řetězec beta-myosinu	MYH7	14q11.2	20-30
Regulační podjednotka lehkého řetězce myosinu	MYL2	12q23-q24	2-4
Esenciální podjednotka lehkého řetězce myosinu	MYL3	3p21.3	1-2
<b>Tenká myofilamenta</b>			
Troponin T	TNNT2	1q32.1	10
Troponin I	TNNI3	19q13.4	7
Alfa-tropomyosin	TPM1	15q22.1	<1
Alfa-actin	ACTC1	15q11q14	<1
<b>Intermediární myofilamenta</b>			
Myosin vazebný protein C	MYBPC3	11p11.2	30-40

<b>Raritní sarkomerické geny</b>			
Troponin C	TNNC1	3p21.1	<1
Alfa-aktinin 2	ACTN2	1q43	<1
Těžký řetězec alfa-myosinu	MYH6	14q11.2	<1
Svalový LIM protein	CSRP3	11p15.1	<1
Myosenin 2	MYOZ2	4q26	<1
Filamin C	FLNC	7g32.1	<1
Titin	TTN	2q31.2	<1
Telethonin	TCAP	17q12	<1
<b>Geny regulující metabolismus kalcia</b>			
Fosfolamban	PLN	6q22.3	<1
Kalsekvestrin	CASQ2	1p13.1	<1
Junktofilin 2	JPH2	20q13.12	<1

V současné době, tedy 30 let od publikace první kauzální mutace v genu *MYH7*, je popsáno více než 2000 mutací a geny asociované s HCM postupně přibývají (Maron, Maron a Semsarian, 2012; Alfares *et al.*, 2015; Ingles *et al.*, 2015; Sabater-Molina *et al.*, 2018). Databáze Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) uvádí aktuálně 26 asociovaných genů ([www.omim.org](http://www.omim.org)). Reportovány jsou však asociace v minimálně 33 genech (Ingles *et al.*, 2019), součástí vyšetřovacích panelů na některých expertních pracovištích je i 67 kandidátních genů (Thomson *et al.*, 2018).

Ze sarkomerických genů je 8 dlouhodobě považováno za jednoznačně kauzální a jsou v současné době zahrnuty ve většině vyšetřovacích HCM panelů. Jedná se o geny *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *ACTC1*, *MYL2*, *MYL3* (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014), blíže popsány v Tab. 2. Toto spektrum sarkomerických genů bylo postupně rozšířeno i na nesarkomerické geny, kódující např. desmosomální proteiny či iontové kanály (Lopes *et al.*, 2015; Walsh, Buchan, *et al.*, 2017). Nicméně systematická evaluace vyšetřovacích panelů ukazuje, že nejsilnější evidence o kauzalitě je u 8 výše uvedených sarkomerických genů (Ingles *et al.*, 2019). Středně silné důkazy o kauzalitě jsou u dalších 3 genů – *CSRP3*, *TNNC1* a *JPH2*. U ostatních genů je zatím evidence slabá nebo téměř žádná (Walsh, Buchan, *et al.*, 2017; Thomson *et al.*, 2018; Ingles *et al.*, 2019).

Ačkoli je HCM především onemocněním sarkomerických proteinů, genetický podklad je zřejmě složitější. Mutace genů pro sarkomerické proteiny jsou totiž kromě HCM dále

asociovány s dilatační kardiomyopatií, restriktivní kardiomyopatií a nonkompaktní kardiomyopatií (Mogensen *et al.*, 2003; McNally a Dellefave, 2009).

Při AD dědičnosti stačí ke způsobení onemocnění mutace v heterozygotní formě. Genomické studie populací pacientů s HCM však ukazují, že až 5 % z nich jsou buď tzv. složení heterozygoti (mají dvě různé mutované alely stejného genu), dvojití heterozygoti (mutace dvou různých genů způsobujících HCM) nebo homozygoti pro jednu konkrétní mutaci. Proto je důležité i při nález jedné mutace, kterou bychom považovali za kauzální, pátrat po dalších patogenních variantách (Richard *et al.*, 2003; Kelly and Semsarian, 2009).

## 1.6 Vztah fenotypu a genotypu

Genetická heterogenita HCM je obrovská (Maron, Martin S. Maron and Semsarian, 2012; Alfares *et al.*, 2015; Ingles *et al.*, 2015) a vztah jednotlivé mutace s konkrétním typickým fenotypem se zatím většinou nedaří uspokojivě vysvětlit. Velmi časté jsou v rodinách tzv. privátní mutace a tedy není možná korelace genotyp-fenotyp na větším souboru pacientů (Maron, Martin S. Maron and Semsarian, 2012; Alfares *et al.*, 2015; Richards *et al.*, 2015). Variabilní penetrance je patrná zejména v genu *MYBPC3*, kde může i v rámci jednotlivých rodin vést ke zcela odlišnému fenotypu (Page *et al.*, 2012). V genu pro *MYBPC3* jsou častým nálezem tzv. founder mutace, které jsou vysoce konzervované v rámci různých geograficky či kulturně izolovaných populací. Penetrance je zde typicky odložena do vyššího věku (Richard *et al.*, 2003; Seidman and Seidman, 2011; Page *et al.*, 2012).

S dostupností molekulárně genetického vyšetření pomocí vysokokapacitních metod můžeme vyšetřovat stále větší množství genů. Výsledkem těchto vyšetření však obvykle není větší záchyt patogenních mutací, ale záchyt většího množství tzv. variant nejasného významu (variant of uncertain significance, VUS), jejichž interpretace je na základě dostupných dat komplikovaná a k jejich definitivnímu zařazení je potřeba více korelovaných genotypů s fenotypy a provedení segregčních analýz (Fokstuen *et al.*, 2011; Meder *et al.*, 2011).

Užitečnou veřejně dostupnou databází pro reportování mutací a jejich vztahu k fenotypu je např. ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Kvůli této genetické heterogenitě jsou tedy data pro vztahy genotyp-fenotyp zatím nedostatečná. Některé práce ukazují, že nález patogenní mutace (G+) u HCM pacientů zhoršuje kardiovaskulární mortalitu, zvyšuje riziko cévní mozkové příhody a progresse symptomatologie ve třídě NYHA ve srovnání s genotyp negativními (G-) pacienty (Olivotto

*et al.*, 2008). Podle novější práce jiných autorů jsou G+ pacienti ve vyšším riziku náhlé srdeční smrti a mají vyšší celkovou i kardiovaskulární mortalitu (van Velzen *et al.*, 2016). Většina publikovaných dat o vztahu konkrétních mutovaných genů a závažnosti fenotypu je však na relativně malém počtu pacientů z jednoho centra.

Pro pacienty v dětském věku byla popsána asociace mutace v genu *MYH7* s časným nástupem onemocnění a rizikem kardiovaskulárních příhod (Major Adverse Cardiac Events, MACE) (Mathew *et al.*, 2017). Publikovaná data z portugalského registru HCM pacientů naznačují asociaci mutace ve stejném genu se systolickou dysfunkcí LK i u dospělých (Lopes *et al.*, 2019). V tomto relativně rozsáhlém registru (528 molekulárně geneticky vyšetřených) byl nález jakékoli patogenní mutace (G+) též asociován s vyšším rizikem náhlé srdeční smrti (Lopes *et al.*, 2019).

Data z pravděpodobně největšího multicentrického registru genotypizovaných pacientů s HCM - SHaRe registry (Sarcomeric Human Cardiomyopathy Registry) – ukazují, že prediktorem nepříznivé prognózy je kromě nižšího věku při diagnóze HCM také nález patogenní, či pravděpodobně patogenní (pathogenic/likely pathogenic, P/LP) mutace v některém z typických sarkomerických genů (Ho *et al.*, 2018). Nález P/LP mutace je dle registru SHaRe spojen s 2násobně zvýšeným rizikem kombinovaného cílového ukazatele (úmrtí, srdeční selhání, maligní arytmie, fibrilace síní). Nález VUS v sarkomerických genech toto riziko zvyšuje přibližně 1,5násobně (Ho *et al.*, 2018). Nevýraznější je při nálezu P/LP mutace riziko rozvoje těžké systolické dysfunkce LK (6násobné) a nutnosti mechanické srdeční podpory či transplantace srdce (4násobné) (Ho *et al.*, 2018). Není bez zajímavosti, že registr obsahuje i data pacientů, kteří mají minimálně dvě P/LP mutace (jsou tedy složenými nebo dvojitými heterozygoty, autoři toto v publikaci nerozlišují) a tvoří 2,8 % ze souboru pacientů s pozitivním genotypem. Výskyt kombinovaného cílového ukazatele byl srovnatelný (HR 1,06) s pacienty s jednou P/LP mutací, měli však sklon k častějšímu rozvoji těžké systolické dysfunkce LK a nutnosti mechanické srdeční podpory či transplantace srdce (HR 7,5; CI 2,7-20,5) (Ho *et al.*, 2018). Zcela ojedinělá je též i komparativní analýza P/LP mutací ve dvou nejčastějších genech – *MYH7* a *MYBPC3*. V souladu s výše citovanými pracemi bylo nalezeno 1,7násobně vyšší riziko kombinovaného cílového ukazatele u mutací v genu *MYH7* proti mutacím v genu *MYBPC3* (Ho *et al.*, 2018).

Důležitým faktorem v interpretaci nálezů je pro HCM typická neúplná penetrance a variabilní expresivita (Page *et al.*, 2012). To nám naznačuje, že roli v dlouhodobém klinickém průběhu onemocnění mají i jiné faktory než pouze mutace na úrovni sarkomerických proteinů. Další



genetické a epigenetické faktory, stejně jako modifikace environmentální, pravděpodobně hrají důležitou funkci, kterou zatím neumíme uspokojivě charakterizovat (Bonaventura and Veselka, 2019). Pokud tedy hovoříme o HCM jako onemocnění s AD Mendelovskou dědičností, jedná se o značné (a nejspíše nepravdivé) zjednodušení skutečné podstaty (Ingles *et al.*, 2005; Blankenburg *et al.*, 2014; Dorn, McNally and McNally, 2014). Mezi genetické modifikátory se řadí obvykle metylace a acetylce DNA, v poslední době se diskutuje význam miRNA (Sabater-Molina *et al.*, 2018). Je možné, že nově objevené varianty jiných než sarkomerických genů, např. pro iontové kanály, desmosomy či titin, nejsou primární příčinou HCM, nýbrž zmiňovanými modifikátory (Lopes *et al.*, 2015; Whiffin *et al.*, 2017).

V klinické praxi je častá koincidence HCM s arteriální hypertenzí (vzhledem k vysoké prevalenci obou onemocnění). Hemodynamická situace při arteriální hypertenzi nutně modifikuje fenotyp HCM. I přes respektování vylučujících kritérií pro diagnózu HCM, se setkáváme též s pacienty s těžkou aortální stenózou, souběžnou diagnózou arteriální hypertenze a HCM. Fyzická zátěž (pozor na tzv. sportovní srdce) a další komorbiditity jako např. diabetes mellitus, obezita a chronická renální insuficience též vedou k modifikaci výsledného fenotypu HCM. Obezita a arteriální hypertenze jsou asociovány s větším objemem myokardu LK. Kromě toho je obezita asociována s arteriální hypertenzí a rovněž i diabetes mellitus. Z uvedených informací je zřejmé, že je v klinické praxi často nemožné rozlišit, co je skutečnou příčinou nebo hlavním modifikátorem hypertrofie LK. V současné době je velmi zkoumaným onemocněním tzv. senilní (wild-type transtyrelinová) amyloidóza, u které se předpokládá taktéž relativně vysoká prevalence a poddiagnostikování choroby v běžné populaci (Rigopoulos *et al.*, 2019). V terénu všech výše uvedených komorbidit je stanovení etiologie hypertrofie LK často velmi komplikované (Bonaventura and Veselka, 2019).

## 1.7 Sekvenování nové generace

Molekulárně genetické vyšetření je u heterogenně geneticky podmíněné HCM časově i finančně náročné (Bortot *et al.*, 2011; Fokstuen *et al.*, 2011). Dříve bylo molekulárně genetické vyšetření možné pouze ve výzkumných centrech. Byly vyšetřovány rodiny se zjevnou dědičnou formou HCM a nákladná analýza DNA zahrnovala pouze několik genů s nejsilnější asociací s HCM. V posledních dvou dekadách byla vyvinuta řada metod označovaných jako tzv. sekvenování nové generace (Next Generation Sequencing, NGS).

Jedná se o vysokokapacitní metody, které v porovnání s klasickou metodou sekvenování (Sangerova metoda) analyzují simultánně velké množství genů. Kromě klasických vyšetření genetické variability, mutační analýzy konkrétních genů a kvantifikace jednotlivých alel je pomocí NGS možné vyšetřit celý exom (whole exome sequencing, WES), případně provést i celogenomové sekvenování (whole genome sequencing, WGS), které může zachytit i příslušné modifikující geny. Výsledkem NGS je produkce obrovského množství výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a bioinformaticky analyzovat za použití mezinárodních databází variant (např. ClinVar, gnomAD). Větší počet vyšetřených genů často bohužel nepřináší lepší výtěžnost diagnostického panelu, obvykle totiž vede k množství nalezených variant DNA, jejichž role pro vznik onemocnění není zatím objasněna (VUS) (Fokstuen *et al.*, 2011; Meder *et al.*, 2011). Ve výsledku je pak multidisciplinární tým (kardiolog, klinický genetik, molekulární genetik) zatížen obtížně interpretovatelnými variantami, které mohou vyšetřované osoby nebo jejich rodiny psychicky stresovat, či dokonce iatrogenizovat (Bonaventura *et al.* 2020). Naopak výhodou NGS je díky relativně nízké ceně a rychlosti vyšetření jeho postupné rozšíření do běžné klinické praxe.

## 1.8 Klasifikace genetických variant

Pro klinické využití molekulárně genetického vyšetření má zásadní význam klasifikace nalezených variant. Vzhledem k velkému množství výstupních dat je v současnosti používán kombinovaný přístup, jehož podkladem jsou následující údaje:

- Frekvence variant v kontrolní populaci, s využitím mezinárodních databází, např. 1000Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org/>), Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), Exome Aggregation Consortium (<http://exac.broadinstitute.org/>)
- Publikované varianty asociované s onemocněním, např. Clinvar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- In silico klasifikace s užitím softwaru, např. Polyphen2, Sorting Intolerant From Tolerant (<https://sift.bii.a-star.edu.sg>) predikujícím možný dopad mutace na strukturu a funkci výsledného proteinu
- Mutace v tzv. evolučně vysoce konzervovaných funkčních doménách proteinů
- Segregační analýzy genotypu s fenotypem v postižených rodinách (silná evidence)

- Funkční studie na animálních modelech či *in vitro* (nákladné, složité)

(Bonaventura a Veselka, 2019)

V roce 2015 byla publikována doporučení pro klasifikaci genetických variant Americkou společností pro lékařskou genetiku a genomiku (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), která vychází z výše uvedených principů. Tato klasifikace dělí nalezené varianty do 5 následujících tříd:

- 1) benigní
- 2) pravděpodobně benigní
- 3) varianta nejasného významu (VUS)
- 4) pravděpodobně patogenní (LP)
- 5) patogenní (P)

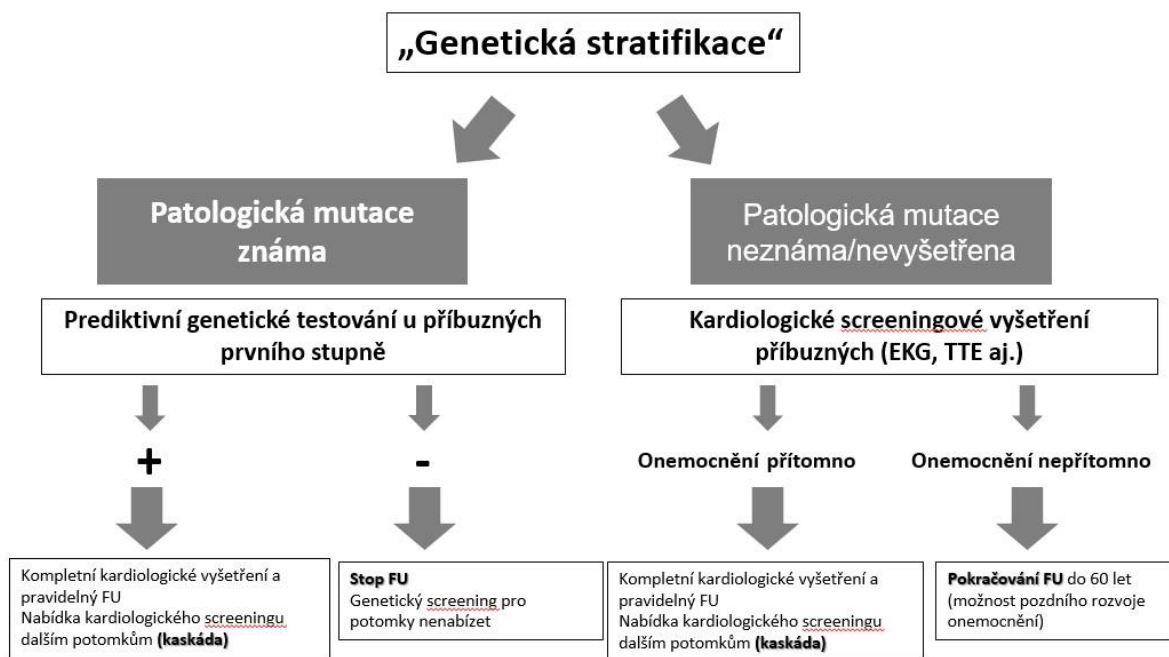
(Richards *et al.*, 2015)

## 1.9 Genetický screening

Genetický screening má v péči o pacienty s HCM a jejich příbuzné významné postavení. Standardním postupem je získání detailní rodinné anamnézy a molekulárně genetické vyšetření probanda se zaměřením na známé geny asociované s HCM (Tab.2). V současné době se v ČR vyšetřují základní kandidátní geny pro kardiovaskulární onemocnění a dle jednotlivých laboratoří jsou v České republice sestaveny panely obsahující 30-200 těchto genů. V panelech je možno se orientovat dle databáze Společnosti lékařské genetiky a genomiky České lékařské společnosti JEP (<https://slg.cz/pracoviste/mg/ngs>). Aktualizované informace o jednotlivých genech lze nalézt v databázích OMIM ([www.omim.org](http://www.omim.org)) nebo Orphanet (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>). U většiny pacientů postačuje vyšetření panelu základních sarkomerických genů (tj. *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*, *ACTC1*, *MYL2*, *MYL3*). Podle doporučených postupů Americké společnosti pro srdeční selhání (Heart Failure Society of America, HFSA) (Hershberger *et al.*, 2018) je vhodné panel rozšířit i o další geny (*CSRP3*, *PLN*, *TTR*, *PRKAG2*, *LAMP2*, *GLA*, *FHL1*), zejména pokud je klinické podezření na syndromickou formu HCM (Tab.1). V případě syndromů Noonanové či LEOPARD nesmíme zapomenout zahrnout i geny způsobující tyto tzv. RASopatie (*PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *RIT1*) (Bonaventura *et al.* 2020).

V případě pozitivního nálezu poté provedeme specifické vyšetření prvostupňového příbuzného na konkrétní gen a mutaci již nalezenou u probanda. Pokud je i u příbuzného zachycena patogenní mutace, je možné kaskádovité vyšetření dalších příbuzných (vzhledem k převažující AD dědičnosti). HCM je u části pacientů spojena s vysokým rizikem náhlé srdeční smrti. Proto je třeba pomyslet na genetické vyšetření a kaskádový rodinný screening při pitevní diagnóze hypertrofické kardiomyopatie. Zásadní je časné zajištění krve či tkáně náhle zemřelého, ze které je následně po informování a souhlasu příbuzných možno provést i molekulárně genetické vyšetření (Bonaventura *et al.* 2020).

Ideálním klinickým scénářem je situace, kdy specifická příčinná mutace u probanda není nalezena u prvostupňového příbuzného. Příbuzného je pak možno vyřadit z dispenzarizace, pravděpodobnost onemocnění je nízká, nicméně de novo mutace jsou samozřejmě možné (Bonaventura *et al.* 2020). Proto vždy upozorňujeme pacienty na nutnost návštěvy lékaře v případě symptomatologie. Vyšetření dětí je podle současných doporučení vhodné mezi 6.-10. rokem věku (Elliott *et al.*, 2014). Hranice byla stanovena na základě pediatrických studií, které ukázaly raritní výskyt závažných komplikací HCM před nástupem puberty (Jensen *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2017). Pokud je molekulárně genetické vyšetření u probanda negativní, pokračujeme v zavedeném pravidelném klinickém sledování prvostupňových příbuzných dle aktuálních doporučení (Elliott *et al.*, 2014; Hershberger *et al.*, 2018). Schéma „genetické stratifikace“ je prezentováno na obrázku.



**Obr. 5.** Algoritmus genetického screeningu. (převzato z Bonaventura *et al.* 2020)

Opačnou klinickou situací je klinicky negativní fenotyp (F-) příbuzného s nálezem patogenní mutace (G+). Na rozdíl od diagnózy dilatační kardiomyopatie, kde je např. mutace v genu *LMNA* jednoznačně spojena s nepříznivou prognózou a je dle ESC guidelines součástí indikace k implantaci ICD (Priori *et al.*, 2015), u HCM nemáme k dispozici silnou evidenci o vývoji onemocnění u asymptomatických nosičů mutací bez klinicky vyjádřeného fenotypu. Riziko náhlé srdeční smrti je u jedinců bez vyjádřené hypertrofie LK obecně nízké. Výjimkou mohou být mutace v *TNNT2*, jak naznačují některé publikace (Moolman *et al.*, 1997; Varnava *et al.*, 2001; Olivotto *et al.*, 2008), nicméně evidence je poměrně slabá.

Je otázkou, zda pouze na základě pozitivního genotypu bez vyjádřeného fenotypu (G+/F-) činit specifická doporučení a navrhnout omezení, např. u profesionálních atletů (Ho, 2010; Maron, Yeates and Semsarian, 2011; Maron, Martin S. Maron and Semsarian, 2012). Většina (G+/F-) pacientů má totiž pravděpodobně příznivou prognózu (Maron, Yeates and Semsarian, 2011; Maron, Martin S Maron and Semsarian, 2012; Elliott *et al.*, 2014; Maron, 2018) a nerozvine významný fenotyp HCM (Maurizi *et al.*, 2019). Vzhledem k variabilní penetranci, která je věkově vázaná, bychom však měli pokračovat v pravidelném klinickém sledování těchto jedinců (Charron *et al.*, 1997; Richard *et al.*, 2003; Michels *et al.*, 2009).

Molekulárně genetické vyšetření je (vzhledem k jeho finanční i časové náročnosti) v běžné klinické praxi smysluplné u pacientů s vysokým stupněm podezření na genetickou příčinu HCM, zejména pokud mají žijící příbuzné, kteří mají zájem se nechat vyšetřit. Základní pravidla jsou shrnuta v Tab. 3.

U pacientek s HCM (nebo v případě, že HCM trpí partner) lze v průběhu gravidity využít metod prenatalního testování, ale s přihlédnutím k neúplné penetranci a variabilní expresivitě, je umělé přerušení těhotenství medicínsky i eticky velmi problematické. Metodou volby je preimplantační testování embryí v rámci asistované reprodukce, s transferem embrya bez P/LP mutace. Tato metoda nese taktéž mnoho nevýhod (zdravotní riziko pro ženu vzhledem k hormonální stimulaci, finanční zátěž pro rodinu, nevelká úspěšnost IVF cyklu). Vždy tedy záleží na rozhodnutí rodiny po poskytnutí komplexní reprodukční a klinicko genetické konzultace (Bonaventura *et al.* 2020). Nález P/LP u mutace jinak zdravého embrya či plodu nemusí znamenat rozvoj onemocnění během života a i v případě rozvoje HCM je klinický průběh variabilní a prognóza je u většiny pacientů příznivá (Maron, 2018).

Důležité je mít na paměti, že přínos molekulárně genetického vyšetření obvykle nespočívá ve zpřesnění klinické diagnostiky u probanda s HCM (např. u sportovního srdce či arteriální hypertenze). Nutné je též si uvědomit fakt, že negativní výsledek molekulárně genetického vyšetření neznamena vyloučení diagnózy HCM.

**Tab. 3.** Základní principy indikace a hodnocení molekulárně genetického vyšetření u pacientů s HCM (převzato z Bonaventura *et al.*, 2020)

Jsou přítomny známky syndromické formy HCM a je šance pro individualizaci léčby po genetické stratifikaci (např. enzymová substituční terapie u Fabryho choroby, Danonova choroba s rizikem časného selhání levé komory apod.)
Pacient má rodinu a rodinné příslušníky, kteří mají zájem o vyšetření, o stanovení jejich rizika onemocnění a následnou péči
Pacient zvažuje narození potomka a má zájem o preimplantační diagnostiku, a tedy primární prevenci onemocnění
Molekulárně genetické vyšetření nelze použít ke stanovení diagnózy HCM
Negativní výsledek molekulárně genetického vyšetření nevylučuje přítomnost dědičné formy HCM

### 1.10 Diagnostická výtěžnost molekulárně genetického vyšetření

Diagnostická výtěžnost molekulárně genetického vyšetření (tj. záchyt P/LP mutace) je velmi variabilní a relativně nízká. Pravděpodobnost záchytu patogenní mutace je obecně vyšší u mladších pacientů a pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou, kde může dosahovat 50-60% (Elliott *et al.*, 2014). U ostatních pacientů se pohybuje okolo 20-40% (Richard *et al.*, 2003) a se zavedením přísnějších klasifikačních kritérií ACMG je záchyt ještě nižší (Richards *et al.*, 2015; Amendola *et al.*, 2016). Vysoká sensitivita genetického testování s nástupem metod NGS tak byla postupně vystřídána vyšší specificitou související s aplikací komplexních klasifikačních kritérií. Ukazuje se, že genetická data a klasifikaci patogenních mutací z minulých dekád bude vhodné periodicky revidovat v kontextu současných poznatků (Richards *et al.*, 2015; Bonaventura a Veselka, 2019).

Nízká výtěžnost molekulárně genetického vyšetření si vyžádala vznik klinických skórovacích systému pro predikci jeho pozitivitu. Nejrozšířenějším je tzv. „Mayo HCM Genotype

Predictor score“ (Mayo Score), který je založen na základních klinických a echokardiografických parametrech a své jméno dostal podle pracoviště autorů (Bos *et al.*, 2014). Přehledně je skórovací systém uveden v tabulce.

**Tab.4.** Mayo Score (upraveno podle Bos JM, *et al.* 2014)

Klinický ukazatel	Hodnota
věk < 45 let	1
tloušťka stěny levé komory $\geq 20$ mm	1
rodinná anamnéza HCM	1
rodinná anamnéza náhlé srdeční smrti	1
reversní (katenoidní) tvar mezikomorového septa	1
arteriální hypertenze	-1

Maximální hodnota: **5**, nejvyšší, udávaná 80% výtěžnost molekulárně genetického vyšetření

Minimální hodnota: **-1**, nejnižší, udávaná 6% výtěžnost molekulárně genetického vyšetření

V původní kohortě 1053 pacientů dosahovala celková výtěžnost genetického vyšetření 34% při vyšetřování 9 genů pro sarkomerické proteiny (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*) (Bos *et al.*, 2014). S rozvojem NGS se v současné době použité panely genů mohou výrazně lišit v počtu jednotlivých genů v závislosti na lokální dostupnosti a finančních možnostech pracovišť.

Jiný systém k predikci výtěžnosti genetického vyšetření vznikl v Kanadě a jedná se o „Toronto HCM genotype score“ (Toronto Score), publikované v roce 2013 (Gruner *et al.*, 2013). Tento systém vychází z podobných klinických a morfologických charakteristik a přehledně je shrnut v Tabulce č. 5. Po aplikaci skórovacího systému se dělí pacienti s HCM do následujících skupin:

Nízká výtěžnost (hodnoty skóre od -9 do -1)

Střední výtěžnost (hodnoty skóre od 0 do 6)

Vysoká výtěžnost (hodnoty skóre od 7 do 19)

V případě poslední skupiny je udávaná výtěžnost molekulárně genetického vyšetření 66 %.

**Tab. 5.** Toronto HCM genotype score (podle Gruner et al. 2013)

Parametr	Hodnota
Věk	
<20	0
20–29	–1
30–39	–2
40–49	–3
50–59	–4
60–69	–5
70–79	–6
≥80	–7
Ženské pohlaví	4
Arteriální hypertenze	–4
Rodinná anamnéza HCM	6
Morfologie IVS reverzní či neutrální	5
Poměr maximální tloušťka LK: tloušťka zadní stěny LK	
<1.46	0
1.47–1.70	1
1.71–1.92	2
1.93–2.26	3
≥2.27	4

Na první pohled je zřejmé, že Toronto Score je mnohem složitější systém, byť používá obdobné klinické informace. Byl vytvořen na menším počtu pacientů (n=471) než o rok později publikované Mayo Score (n=1053). Oba systémy byly následně retrospektivně testovány k predikci výtežnosti na menším souboru (n=77) dětských pacientů a ukázaly se jako funkční (Newman *et al.*, 2018). Autoři Mayo Score též provedli vlastní validační studii za použití odlišné klasifikace nalezených variant (Murphy *et al.*, 2016).

V běžné praxi nepoužívaným je „Sydney genotype prediction score“, vycházející ze 4 parametrů (vysoký věk, mužské pohlaví, přítomnost arteriální hypertenze a „neasymetrická“ morfologie IVS), predikujícím situaci opačnou – tj. nezachycení P/LP mutace. Autoři skóre jej prezentují k odhadu tzv. nefamiliálních HCM a podle tvůrců by mělo mít srovnatelnou spolehlivost jako Mayo a Toronto Score (Ingles *et al.*, 2017).

Kromě robustnějšího vzorku pacientů, který dal systému vzniknout, spočívá výhoda Mayo Score v jeho zapamatovatelnosti, a tedy i snadnému použití v běžné klinické praxi. Proto v našem výzkumu pracujeme výhradně s tímto systémem.



## 2 Cíle práce

Naší hlavní hypotézou je, že existují klinické a morfologické charakteristiky HCM, které souvisí s pozitivním genotypem. Vedlejší hypotézou je, že zařazení velkého počtu genů do diagnostického panelu by mohlo vést k vyšší výtěžnosti molekulárně genetického vyšetření. Z hypotéz plynou následující cíle naší práce.

### 2.1 Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice

Primárním cílem naší práce bylo vyšetření molekulárně genetického podkladu HCM u pacientů v České republice. První pokus o mapování genetického pozadí HCM v ČR proběhl v průběhu let 2005-2009 na Kardiologické klinice FNKV a 3.LF UK a v Kardiovaskulárním centru FN Motol. Celkem bylo tehdy molekulárně geneticky vyšetřeno 100 pacientů s HCM za použití klasické metody (Sanger) sekvenování u 4 genů - *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3* a *TNNT2* (Curila *et al.*, 2012).

V současné době máme pomocí metod NGS možnost genetický podklad HCM vyšetřit mnohem podrobněji. Naše studie není limitována předpokládanou prevalencí vybraných genů (viz výše) a vyšetřujeme sarkomerické i nesarkomerické geny. Díky podpoře z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR (reg. č. 15–34904A) můžeme vyšetřit několikanásobně větší množství pacientů než před 10 lety, financování pokrylo cca 60 NGS vyšetřených pacientů ročně, grantová podpora probíhala v letech 2015-2018.

### 2.2 Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem

Se získanými primárními daty z NGS dále pracujeme. Naší cílem je identifikace klinických a morfologických charakteristik, které souvisí s pozitivním výsledkem (G+, nález P/LP varianty) molekulárně genetického vyšetření. Získaná data porovnáme s publikovanými daty zahraničních autorů. Není nám známo, že by molekulárně genetický podklad HCM pacientů v ČR byl dosud v takovémto rozsahu vyšetřen. Nalezené asociace fenotypu s pozitivním genotypem se mohou lišit od kohort severoamerických pacientů (Binder *et al.*, 2006; Bos *et al.*, 2014), na kterých byly morfologické charakteristiky G+ pacientů původně popsány. V tomto smyslu budou naše data prioritní.

### 2.3 Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření

Výtěžnost molekulárně genetického vyšetření je variabilní a spíše nízká. U první české studie z let 2005-2009 činila výtěžnost při 4 vyšetřovaných genech přesně 40 % (Curila *et al.*, 2012). V originální kohortě Mayo Score pacientů bylo vyšetřováno 9 základních sarkomerických genů a výtěžnost byla 34 % (Bos *et al.*, 2014).

Kritéria pro definování patogenicity nalezených variant se však v průběhu let zásadně zpřísnila. V roce 2015 byla publikována doporučení ACMG pro klasifikaci genetických variant, která jsou velmi komplexní (Richards *et al.* 2015).

Cílem naší práce bylo vyšetřit u pacientů pomocí NGS až 229 genů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními (zahrnující i všechny dosud známé geny asociované s HCM) a zhodnotit jejich patogenicitu za použití striktních ACMG kritérií. Rozsah genů, metoda vyšetření i způsob klasifikace se výrazně liší od původní Mayo kohorty. Dali jsme si za cíl zjistit, jestli predikce pomocí Mayo Score bude fungovat i za těchto podmínek.

### 2.4 Kaskádovité vyšetřování příbuzných

Naším primárním cílem je genotypizace HCM probandů. V případě záchytu P/LP mutace nám metody NGS umožňují cílené kaskádovité vyšetřování příbuzných a časnou prevenci kardiovaskulárních příhod před klinickou manifestací HCM (Obr. 5). Genotypizaci příbuzných si tedy klademe za sekundární cíl naší studie. Nalezená data následně použijeme k optimalizaci dispenzarizace příbuzných pacientů s HCM.

### 2.5 Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace

Zhruba u dvou třetin všech pacientů s HCM diagnostikujeme klidovou nebo provokovanou obstrukci (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014). Alkoholová septální ablace (ASA) je bezpečnou a účinnou metodou v léčbě obstrukce LVOT u symptomatických pacientů (Veselka, Jensen, Liebrechts, Januska, Krejci, Bartel, Dabrowski, Hansen, Almaas, *et al.*, 2016; Veselka, Polaková and Bonaventura, 2019). Genetické pozadí a jeho možný vztah k výsledkům procedury a prognóze těchto pacientů není dosud znám. Cílem naší práce je zjistit, jestli se výsledky procedury a prognóza u pacientů po ASA s pozitivním genotypem (G+) liší od pacientů po ASA s negativním genotypem (G-). Práce zabývající se tímto tématem dosud ve světě nebyla publikována (dle databáze PubMed k 1. dubnu 2020).

## 3 Metody

### 3.1 Soubor pacientů

Do základní studie bylo zařazeno konsektivně 336 dospělých nepříbuzných pacientů s klinickou diagnózou HCM v terciárním kardiovaskulárním centru (Kardiologická klinika 2. LF UK a FN Motol). Vzorky DNA pro NGS analýzu byly od pacientů odebrány mezi lety 2005 a 2017. Z vyšetřovaných pacientů jich bylo 129 léčeno mezi lety 1998 a 2017 alkoholovou septální ablací (ASA).

Diagnóza HCM byla vždy stanovena zkušeným kardiologem na základě fyzikálního vyšetření, EKG a nález hypertrofie LK  $\geq 15$  mm při echokardiografickém vyšetření a/nebo MRI srdce (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014). Byly vyloučeny běžné hemodynamické příčiny hypertrofie LK. Pokud měl pacient diagnózu arteriální hypertenze, tato musela být adekvátně léčena, aby nemohla být prohlášena za hlavní příčinu hypertrofie LK. K vyloučení této sekundární hypertrofie LK byla prováděna kontrolní echokardiografická vyšetření v časových odstupech při adekvátní antihypertenzní terapii. U všech pacientů byla kromě standardního echokardiografického protokolu vyšetřena i morfologie IVS a zařazena do jedné ze 3 kategorií – reverzní, sigmoidní a neutrální tvar IVS. Čtvrtou morfologickou kategorií tvořili pacienti s apikální formou HCM (Binder *et al.*, 2006).

U všech pacientů byl prováděn sběr demografických, klinických a echokardiografických dat. Všichni pacienti byli sledováni v intervalech 3-12 měsíců podle jejich aktuálního klinického stavu. Symptomatickým pacientům (New York Heart Association (NYHA) třída III-IV nebo synkopa při zátěži) s významnou obstrukcí LVOT (maximální gradient v klidu nebo při provokaci  $\geq 50$  mm Hg) při maximální tolerované farmakoterapii byla nabídnuta septální redukční terapie. ASA byla indikována na základě pečlivého zhodnocení morfologických charakteristik multidisciplinárním týmem. Všechny ASA procedury byly prováděny jedním zkušeným intervenčním kardiologem, jak již bylo popsáno v předchozích publikacích (Veselka, Tomasov and Zemanek, 2012; Veselka *et al.*, 2014) a všechny procedury byly prováděny za kontroly myokardiální kontrastní echokardiografií (Veselka *et al.*, 2009). Všem pacientům byla před ASA procedurou zavedena dočasná transvenózní kardiostimulace (DKS). Pacienti byli po výkonu monitorováni minimálně 48 hodin na koronární jednotce a pokud nebyly přítomny závažné poruchy srdečního převodního systému, tak byla DKS po této

době odstraněna. Do celkové doby 7 dní pak byli pacienti po ASA hospitalizováni za nepřetržitě telemetrické EKG monitorace. V případě kompletního atrioventrikulárního bloku či jiných významných poruch srdečního převodního systému byl pacientům implantován trvalý kardiostimulátor.

Data z molekulárně genetické analýzy byla porovnáována s klinickými a echokardiografickými charakteristikami. U všech pacientů byla provedena kalkulace Mayo Score. Jeden bod byl přidělen za následující faktory: věk při dg. HCM < 45 let, reverzní typ IVS, tloušťka LK  $\geq$  20 mm, rodinná anamnéza HCM, rodinná anamnéza náhlé srdeční smrti. Jeden bod byl odečten za přítomnost arteriální hypertenze, bez ohledu na její tíži. Mayo Score u pacientů nabývalo hodnot od -1 do 5 a bylo porovnáno s nálezy P/LP mutací při molekulárně genetickém vyšetření.

### 3.2 Molekulárně genetické vyšetření

Izolace DNA byla prováděna ze vzorku nesrážlivé žilní krve za použití kitů FlexiGene® DNA AGF3000 Kit (QIAGEN, Germany) a AutoGen Flex 3000 (Autogen, Holliston, USA) dle doporučení výrobce. V průběhu studie byly použity celkem 3 panely genů (na základě aktuálně dostupných informací o kauzalitě genů, získávaných dat, rozhodnutí klinika a molekulárního genetika a rozpočtu financí): TruSight Cardiomyopathy (Illumina, San Diego, USA; 46 genů), TruSight Cardio (Illumina, San Diego, USA; 174 genů), a na zakázku vyrobený komplexní srdeční panel pomocí SeqCap EZ Choice Library (Roche NimbleGen, Madison, USA) který obsahuje 229 genů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními. Příprava DNA knihoven byla provedena dle doporučení výrobce. DNA knihovny byly poté sekvenovány (párové sekvenování, fragmenty 2x150 bp) pomocí Illumina MiSeq nebo MiniSeq platformy (Illumina, Inc. San Diego, USA).

Sekvenování nové generace (masivní paralelní sekvenování) produkuje velké množství dat a vyžaduje rozsáhlou bioinformatickou analýzu. Pro tuto analýzu byl použit “in-house” vyvinutý pipeline podle Genome Analysis Toolkit (GATK) doporučení k identifikaci germinálních variant (DePristo *et al.*, 2011; Van der Auwera *et al.*, 2013). Hrubá data z NGS byla mapována za pomoci algoritmu Burrows-Wheeler Alignment Maximal Exact Match (BWA-MEM) (Li and Durbin, 2010) k referenčnímu humánnímu genomu GRCh37/hg19. PCR duplikáty (označující čtení totožné sekvence a délky), které by zkreslovaly kvalitu sekvenované oblasti, byly v této fázi odstraněny a dále nezahrnovány do bioinformatické

analýzy. Následně byla provedena recalibrace kvality bází (umožňuje detekci a odstranění systémových chyb sekvenčního procesu) pomocí GATK a poté byla provedena detekce mutací/variant (tzv. variant calling) za použití GATK-HaplotypeCaller (DePristo *et al.*, 2011; Van der Auwera *et al.*, 2013).

Finálním krokem bioinformatického zpracování sekvenčních dat je genotypování, tj. nalezení odchylek od referenčního genomu s určením, kde se tato varianta nachází. Pro prioritizaci a anotaci variant byl použit Illumina VariantStudio Software v3.0 (Illumina, San Diego, USA) a BaseSpace Variant Interpreter (Illumina, San Diego, USA). Varianty s hloubkou čtení < 10x, synonymní varianty, varianty v intronech v non-splice regionech a varianty s frekvencí minoritní alely (minor allele frequency, MAF) vyšší než pro HCM kalkulovanou frekvenci vzácných variant, tj.  $4 \times 10^{-5}$  (Whiffin *et al.*, 2017) byly z další analýzy odstraněny.

Pro analýzu funkčního dopadu doposud nepopsaných variant nebo VUS existuje mnoho predikčních programů, založených na různých algoritmech. Tyto algoritmy obvykle využívají fylogenetickou konzervovanost dané oblasti, chemické odlišnosti ve složení polypeptidového řetězce či strukturní charakteristiky polypeptidového řetězce a umožňují odhadnout dopad varianty na konkrétní proteinový produkt. V naší studii jsme použili software Sorting Tolerant From Intolerant (SIFT) a PolyPhen-2 k predikci funkčního dopadu missense variant. Pro zhodnocení klinického významu nalezených variant jsme použili databáze ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) a Human Gene Mutation Database (HGMD) (Stenson *et al.*, 2003). Všechny významné varianty byly klasifikovány podle ACMG guidelines (Richards *et al.*, 2015) do 5 tříd: 1) benigní, 2) pravděpodobně benigní, 3) VUS, 4) pravděpodobně patogenní (LP), 5) patogenní (P). Všechny P/LP varianty byly následně ještě confirmovány klasickou Sangerovou metodou sekvenování.

### 3.3 Statistická analýza

U měřených parametrů byla vypočtena průměrná hodnota a směrodatná odchylka. Pro vyjádření délky sledování (follow-up) byl vypočítán medián a příslušné kvartily. Pro porovnání klinických a echokardiografických parametrů mezi G+ a G- skupinami pacientů byl použit Mann-Whitney test, Fisherův test a Studentův t test, dle typu hodnocené proměnné.

Při analýze dat u pacientů po ASA byl použit model Coxovy regrese pro identifikaci prediktorů mortalitních příhod. Následující klinické a echokardiografické proměnné s možným vlivem na mortalitní příhody byly nejprve otestovány v univariantsním modelu: věk v době ASA, pohlaví, obstrukce LVOT, tloušťka IVS, rozměr levé síně. Proměnné s hodnotami  $p < 0.15$  byly následně otestovány v multivariantsní analýze za využití stepwise Coxovy regrese zpětné eliminace proměnných. Dlouhodobá mortalita pacientů byla analyzována Kaplan-Meierovou metodou a rozdíly mezi skupinami G+ a G- analyzovány log-rank testem. Kaplan-Meierovy křivky G+ a G- pacientů byly adjustovány na věk v době ASA a tloušťku IVS před ASA.

Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou. Pro statistickou analýzu byl použit software Prism verze 7.04 a verze 8.1.1. (GraphPad Software Inc., USA).

## 4 Výsledky

### 4.1 Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice

Základní klinické charakteristiky všech 336 vyšetřených pacientů s HCM jsou přehledně uvedeny v tabulce.

**Tab 7.** Základní charakteristiky souboru pacientů.

Počet pacientů	(n= 336)
Věk v době diagnózy, roky	53 ± 15
Ženské pohlaví, <i>n</i> (%)	139 (41)
Rodinná anamnéza HCM, <i>n</i> (%)	37 (11)
Rodinná anamnéza SCD, <i>n</i> (%)	16 (5)
Arteriální hypertenze, <i>n</i> (%)	157 (47)
MLVWT (mm)	20 ± 5
Tvar IVS, <i>n</i> (%)	
Sigmoidní	97 (29)
Reverzní	92 (27)
Neutrální	140 (42)
Apikální forma HCM	7 (2)
Obstrukce, <i>n</i> (%)	230 (68)
Arytmie, <i>n</i> (%)	
Supraventrikulární	72 (21)
Komorová	22 (7)
Nesetrvalá KT	15 (5)
Setrvalá KT	5 (1)
Fibrilace komor	2 (1)
Farmakoterapie, <i>n</i> (%)	
Beta blokátory	149 (44)
ACE inhibitory	62 (18)
Sartany	21 (6)
Ca blokátory	60 (18)
Diuretika	59 (18)
Amiodaron	6 (2)
Ostatní antiarytmika	10 (3)

Publikováno (Bonaventura *et al.*, 2019)

Vysvětlivky: SCD – náhlá srdeční smrt, MLVWT – maximální tloušťka stěny levé komory, IVS – interventrikulární septum, KT – komorová tachykardie, ACE – angiotensin konvertující enzym

Celkem jsme identifikovali 276 variant v celkem 71 různých genech u 188 (56 %) HCM pacientů. Nalezené varianty v genech, řazené dle četnosti výskytu, jsou uvedeny v Tab. 8.

**Tab. 8.** Nalezené varianty v genech, řazené dle četnosti výskytu, bez klasifikace patogenicity. Názvy genů v originálním znění.

Gen	Originální název genu	Varianty u pacientů		
		1.	2.	3.
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac	58	16	0
MYH7	myosin heavy chain 7, cardiac muscle, beta	27	4	0
SCN5A	sodium channel, voltage-gated, type 5, alpha subunit	4	6	1
TNNT2	troponin T type 2	7	0	0
DSP	desmoplakin	4	3	2
ACTN2	actinin, alpha 2	5	2	1
CSRP3	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)	6	1	0
MYH6	myosin heavy chain 6, cardiac muscle, alpha	2	3	1
MYOM1	myomesin 1	4	1	0
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	4	0	0
DSG2	desmoglein 2	0	3	0
MYL2	myosin light chain 2	2	1	0
CACNA1C	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit	2	1	0
GLA	galactosidase, alpha	3	0	0
NEBL	nebulette	2	0	0
MYL3	myosin light chain 3	2	0	0
TNNI3	troponin I type 3	0	1	0
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	1	0	0
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	1	0	0

Publikováno (Bonaventura *et al.* 2019)

Vysvětlivky: pořadí 1., 2., 3. odkazuje na záchyt více variant u jednoho konkrétního pacienta, tyto jsou sestupně tříděny dle patogenicity.



Kompletní seznam všech nalezených významných variant ve všech genech je uveden v Tab 9. V tabulce je též uveden výskyt variant ve veřejně dostupné databázi ClinVar.

**Tab. 9.** Kompletní seznam všech nalezených významných variant ve všech genech, tříděno abecedně, varianty jsou v 5. sloupci značeny od třídy 3 (VUS) do třídy 5 (patogenní). Názvy genů v originálním znění.

Gen	Originální název	Změna na úrovni nukleotidu a proteinu	Počet	ACMG	Výskyt v ClinVar (počet reportů)
<b>ABCG5</b>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 5</i>	ABCG5 p.Arg198Gln	1		Uncertain significance (3)
<b>ACTC1</b>	<i>actin, alpha, cardiac muscle 1</i>	ACTC1 c.76G>A p.(Asp26Asn)	1	3	
<b>ACTN2</b>	<i>actinin, alpha 2</i>	ACTN2 c.1193G>T p.(Arg398Leu)	1	3	
		ACTN2 c.1549C>T p.(Leu517Phe)	2	3	
		ACTN2 c.1552C>T p.(His518Tyr)	1	3	
		ACTN2 c.1822C>T, p.(Arg608Trp)	1	3	
		ACTN2 c.2147C>T, p.(Thr716Met)	1	3	
		ACTN2 p.Arg93Gln	1		Uncertain significance (3)
		ACTN2 p.His518Tyr	1		Uncertain significance (1)
<b>ANKRD1</b>	<i>ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)</i>	ANKRD1 p.Ala276Val	1		Benign(5); Likely benign(5); Uncertain significance(1)
<b>BAG3</b>	<i>BCL2-associated athanogene 3</i>	BAG3 c.1523A>G p.(Tyr508Cys)	1	3	
<b>CACNA1C</b>	<i>calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>	CACNA1C c.5693+2T>A	1	3	
		CACNA1C c.5893T>C, p.(Ser1965Pro)	1		
		CACNA1C p.Arg518His	1		Likely pathogenic(1); Pathogenic(1); Uncertain significance(1)
<b>CACNA2D1</b>	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1</i>	CACNA2D1 p.Ser709Asn	2		

<b>CAV3</b>	<i>caveolin 3</i>	CAV3 c.233C>T, p.(Thr78Met)	1		
		CAV3 c.89A>G p.(Lys30Arg)	1	3	
<b>COL5A2</b>	<i>collagen, type V, alpha 2</i>	COL5A2 p.Pro1359Leu	1		
		COL5A2 p.Val95Asp	1		
<b>COX15</b>	<i>COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)</i>	COX15 p.Arg406Gln	1		
<b>CRYAB</b>	<i>crystallin, alpha B</i>	CRYAB c.116C>T p.(Pro39Leu)	1	3	
		CRYAB p.Pro51Leu	1		Likely benign(7); Uncertain significance(1)
<b>CSRP3</b>	<i>cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)</i>	CSRP3 c.208G>T p.(Gly70Trp)	4	3	
		CSRP3 c.208G>T, p.(Gly70Trp) HOM	1	3	
		CSRP3 c.520A>G, p.(Lys174Glu)	1	3	
		CSRP3 p.Gly70Trp HOM	1		
<b>DES</b>	<i>desmin</i>	DES c.728A>G, p.(His243Arg)	1	3	
<b>DMD</b>	<i>dystrophin</i>	DMD c.10262+1G>A	1		Benign(1); Uncertain significance(3)
		DMD c.1934A>G, p.(Asp645Gly)	1	3	
		DMD p.Ile99Val	1		Likely benign(1); Uncertain significance(4)
<b>DSC2</b>	<i>desmocollin 2</i>	DSC2 c.1223C>T p.(Thr408Ile)	1	3	
		DSC2 c.1661A>G p.(Gln554Arg)	1	3	
<b>DSG2</b>	<i>desmoglein 2</i>	DSG2 c.166G>A, p.(Val56Met)	2		Likely benign(5); Pathogenic(1); Uncertain significance(4)
		DSG2 c.216G>T, p.(Lys72Asn)	1	3	
<b>DSP</b>	<i>desmoplakin</i>	DSP c.242G>A p.(Cys81Tyr)	1	3	
		DSP c.2684A>G, p.(Tyr895Cys)	1	3	Uncertain significance (5)
		DSP c.3550C>T p.(Arg1184Trp)	1		

		DSP c.3616T>A p.(Leu1206Ile)	1	3	
		DSP c.4961T>C, p.(Leu1654Pro)	1	3	
		DSP c.688G>A, p.(Asp230Asn)	1		
		DSP c.8068C>A p.(Pro2690Thr)	1	3	
		DSP c.8467C>G p.(Pro2823Ala)	1	3	
		DSP p.Thr2665Met	1		Uncertain significance (1)
<b>DTNA</b>	<i>dystrobrevin, alpha</i>	DTNA p. p.Thr205Met	1		
		DTNA p.Gln106Glu	1		Uncertain significance (2)
<b>ELN</b>	<i>elastin</i>	ELN c.1408C>T p.(Gln470*)	1	4	
<b>EMILIN1</b>	<i>elastin microfibril interfacer 1</i>	EMILIN1 p.Leu606ValfsTer43 (delCT)	1		
<b>FHL2</b>	<i>four and a half LIM domains 2</i>	FHL2 c.191C>A, p.(Ala64Asp)	1	3	
		FHL2 c.467A>T p.(Lys156Ile)	1	3	
		FHL2 c.501+1G>T	1	3	
		FHL2 p.Leu21Gln	1		Uncertain significance (1)
<b>FKTN</b>	<i>fukutin</i>	FKTN c.166-4A>G	1		Benign(1);Uncertain significance(6)
<b>FLNA</b>	<i>filamin A</i>	FLNA p.Arg1532Gln	1		
		FLNA p.Leu1540Val	1		
		FLNA p.Lys1538Thr	1		
<b>FLNC</b>	<i>filamin C</i>	FLNC c.4564C>A p.(Gln1522Lys)	1	3	
		FLNC c.4660A>C p.(Ile1554Leu)	1	3	
<b>GLA</b>	<i>galactosidase, alpha</i>	GLA c.644A>G p.(Asn215Ser)	1	5	
		GLA c.902G>A p.(Arg301Gln)	1	5	
		GLA c.937G>T p.(Asp313Tyr)	1		
<b>GPD1L</b>	<i>glycerol-3- phosphate dehydrogenase 1- like</i>	GPD1L c.370A>G, p.(Ile124Val)	1		

		GPD1L c.370A>G, p.(Ile124Val)	1		
<b>HCN4</b>	<i>hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4</i>	HCN4 p.Glu1193Gln	1		Benign(1);Likely benign(2);Uncertain significance(1)
<b>IRX4</b>	<i>Iroquois Homeobox Protein 4</i>	IRX4 c.375C>G p.(Tyr125*)	1	3	
<b>JAG1</b>	<i>jagged 1 (Alagille syndrome)</i>	JAG1 p.Thr962Ala	1		
<b>JUP</b>	<i>junction plakoglobin</i>	JUP p.Ser24Leu	1		Uncertain significance (1)
<b>KCNA5</b>	<i>potassium voltage- gated channel, shaker-related subfamily, member 5</i>	KCNA5 c.633G>C, p.(Glu211Asp)	1		
		KCNA5 p.Thr374Ile	1		
<b>KCNH2</b>	<i>potassium voltage- gated channel, subfamily H, member 2</i>	KCNH2 c.3107G>A p.(Gly1036Asp)	1	3	
		KCNH2 c.526C>T p.Arg176Trp	1		Likely benign(1);Uncertain significance(5)
<b>KCNJ2</b>	<i>potassium inwardly- rectifying channel, subfamily J, member 2</i>	KCNJ5 p.Met210Ile	1		Likely benign (1)
<b>KCNQ1</b>	<i>potassium voltage- gated channel, KQT-like subfamily, member 1</i>	KCNQ1 p.Gly269Ser	1		Pathogenic (4) for long QT syndrome
<b>LAMA4</b>	<i>laminin, alpha 4</i>	LAMA4 p.Arg730Cys	1		
		LAMA4 p.Ile36Thr	1		
<b>LDB3</b>	<i>LIM domain binding 3</i>	LDB3 c.1838C>T, p.(Pro613Leu)	1	3	
		LDB3 p.Ala222Thr	1		
		LDB3 p.Gly508Cys	1		
		LDB3 p.Gly653Arg	1		
<b>LMNA</b>	<i>lamin A/C</i>	LMNA c.1930C>T p.(Arg644Cys)	1		
<b>MIB1</b>	<i>mindbomb homolog 1</i>	MIB1 c.1111C>T p.(Arg371*)	1	3	

		MIB1 c.1971del p.(Asn658Thrfs*7)	1	3	
		MIB1 c.908+2T>A	1	3	
<b>MYBPC3</b>	<i>myosin binding protein C, cardiac</i>	MYBPC3 c.1000G>A p.(Glu334Lys)	1	3	
		MYBPC3 c.1028delC p.(Thr343MetfsTer7)	2	5	
		MYBPC3 c.1078A>T p.(Lys360Ter)	1	5	
		MYBPC3 c.1468G>A p.(Gly490Arg)	3	3	
		MYBPC3 c.1484G>A, p.(Arg495Gln)	1	4	Pathogenic/Likely pathogenic (12)
		MYBPC3 c.1558G>T p.(Glu520*)	2	5	
		MYBPC3 c.1577_1580dup, p.(Cys528Thrfs*4)	1	5	
		MYBPC3 c.1736A>C p.(Lys579Thr)	1	3	
		MYBPC3 c.1790G>A p.(Arg597Gln)	1	3	
		MYBPC3 c.1855G>A p.(Glu619Lys)	1		
		MYBPC3 c.185dup p.(Arg63Thrfs*50)	1	5	
		MYBPC3 c.1897+1G>A	1	5	Pathogenic (4)
		MYBPC3 c.2215G>T p.(Glu739*)	1	5	
		MYBPC3 c.2309-3C>G	1		
		MYBPC3 c.2381C>T, p.(Pro794Leu)	1	3	
		MYBPC3 c.2382delG p.(Pro795LeufsTer27)	1	5	
		MYBPC3 c.2429G>A p.(Arg810His)	1	3	
		MYBPC3 c.2540_2547delinsT p.(Tyr847Leufs*30)	1	5	
		MYBPC3 c.2639_2642dup, p.(Ser882Argfs*3)	2	5	
		MYBPC3 c.2686G>A, p.(Val896Met)	2		
		MYBPC3 c.2687T>G, p.(Val896Gly)	1	3	

		MYBPC3 c.2815C>T p.(Arg939Trp)	1	3	
		MYBPC3 c.3097C>T p.(Arg1033Trp)	1	3	
		MYBPC3 c.3130C>T p.(Gln1044*)	1	5	
		MYBPC3 c.3166dup p.(Ala1056Glyfs*9)	1	5	
		MYBPC3 c.3190+5G>A	1	5	Pathogenic/Likely pathogenic (9)
		MYBPC3 c.3343G>A, p.(Val115Ile)	1	3	
		MYBPC3 c.3392T>C, p.(Ile1131Thr)	1		
		MYBPC3 c.3413G>C, p.(Arg1138Pro)	1	3	
		MYBPC3 c.3490+1G>T	3	5	Pathogenic (2)
		MYBPC3 c.3580dup p.(Ala1194Glyfs*14)	1	5	
		MYBPC3 c.3697C>T, p.(Gln1233*)	10	5	
		MYBPC3 c.373_374del, p.(Ala125*)	1	5	
		MYBPC3 c.3767_3769del p.(Thr1256del)	1	4	
		MYBPC3 c.3811C>T p.(Arg1271*)	1	4	
		MYBPC3 c.442G>A p.(Gly148Arg)	1	3	
		MYBPC3 c.565G>A p.(Val189Ile)	1		
		MYBPC3 c.62T>G p.(Val21Gly)	1	3	
		MYBPC3 c.696del, p.(Phe233Serfs*67)	1	5	
		MYBPC3 c.724T>C, p.(Ser242Pro)	1	3	
		MYBPC3 c.772+1G>A	7	5	Pathogenic/Likely pathogenic (4)
		MYBPC3 c.842G>A p.(Arg281Gln)	1		
		MYBPC3 c.977G>A, p.(Arg326Gln)	9		

<b>MYH6</b>	<i>myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha</i>	MYH6 c.3010G>T, p.(Ala1004Ser)	1		
		MYH6 c.3346C>A p.(Arg1116Ser)	1	3	
		MYH6 c.3469G>A, p.(Gly1157Arg)	1	3	
		MYH6 c.3607dup p.(Ala1203Glyfs*30)	1	3	
		MYH6 c.3902C>T p.(Ser1301Leu)	1	3	
		MYH6 p.Gln1534His	1		Uncertain significance (1)
<b>MYH7</b>	<i>myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta</i>	MYH7 c.1063G>A, p.(Ala355Thr)	1	4	
		MYH7 c.1207C>T, p.(Arg403Trp)	1	5	
		MYH7 c.1436A>G. p.(Asn479Ser)	1	4	
		MYH7 c.161G>A p.(Arg54Gln)	1	3	
		MYH7 c.1816G>A p.(Val606Met)	1	5	Pathogenic/Likely pathogenic (11)
		MYH7 c.1868A>G p.(Asn623Ser)	1	3	
		MYH7 c.1979C>A, p.(Thr660Asn)	1	3	
		MYH7 c.2039C>T p.(Ser680Phe)	1	3	
		MYH7 c.2051T>C p.(Met684Thr)	1	3	
		MYH7 c.2081G>A, p.(Arg694His)	1	3	
		MYH7 c.2167C>G p.(Arg723Gly)	1	5	
		MYH7 c.2207T>C p.(Ile736Thr)	1	5	Pathogenic (9)
		MYH7 c.2221G>A, p.(Gly741Arg)	1	4	Pathogenic (8)
		MYH7 c.2221G>T p.(Gly741Trp)	1	4	Pathogenic (8)
		MYH7 c.2333A>T p.(Asp778Val)	1	4	
		MYH7 c.2347C>T, p.(Arg783Cys)	1	3	

		MYH7 c.2389G>A p.(Ala797Thr)	1	5	Pathogenic/Likely pathogenic (12)
		MYH7 c.2546T>C p.(Met849Thr)	1	4	
		MYH7 c.2609G>A p.(Arg870His)	1	3	
		MYH7 c.2770G>A p.(Glu924Lys)	1	5	
		MYH7 c.2882T>G, p.(Leu961Arg)	2	3	
		MYH7 c.3286G>T, p.(Asp1096Tyr)	1	3	
		MYH7 c.4283T>C p.(Leu1428Ser)	1	3	
		MYH7 c.428G>A p.(Arg143Gln)	2	4	
		MYH7 c.4472C>G, p.(Ser1491Cys)	1		
		MYH7 c.4487A>C p.(Glu1496Ala)	1	3	
		MYH7 c.497T>G p.(Leu166Glu)	1	3	
		MYH7 c.5527A>G p.(Ser1843Gly)	1	3	
		MYH7 c.5561C>T, p.(Thr1854Met)	1	3	
<b>MYL2</b>	<i>myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow</i>	MYL2 c.401A>C p.(Glu134Ala)	1	3	Likely pathogenic(3);Uncertain significance(5)
		MYL2 c.431C>A, p.(Pro144His)	1	3	
		MYL2 c.496G>A p.(Asp166Asn)	1	3	
<b>MYL3</b>	<i>myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow</i>	MYL3 c.170C>G, p.(Ala57Gly)	1	4	
		MYL3 c.460C>T, p.(Arg154Cys)	1	4	
<b>MYOM1</b>	<i>myomesin 1</i>	MYOM1 c.1175-2A>T	1	3	
		MYOM1 c.1230del p.(Lys410Asnfs*13)	1	3	
		MYOM1 c.1482T>G p.(Ser494Arg)	1	3	



		MYOM1 c.4222G>A, p.(Asp1408Asn)	1		
		MYOM1 c.920G>C p.(Arg307Pro)	1	3	
<b>MYOZ2</b>	<i>myozenin 2</i>	MYOZ2 c.343C>T, p.(Arg115*)	1	3	
<b>MYPN</b>	<i>myopalladin</i>	MYPN c.1012C>T p.(Arg338Cys)	1	3	
		MYPN c.3205C>A p.(Arg1069Ser)	1	3	
<b>NEBL</b>	<i>nebulette</i>	NEBL c.267C>G p.(Tyr89Ter)	1	3	
		NEBL c.614A>G p.(Asn205Ser)	1	3	
<b>NEXN</b>	<i>nexilin (F actin binding protein)</i>	NEXN c.1190G>A, p.(Arg397Gln)	1	3	
<b>NKX2-5</b>	<i>NK2 transcription factor related, locus 5</i>	NKX2-5 p.Ala119Ser het confirmed	1		Benign(1);Likely benign(2);Pathogenic(1) for hypothyroidism
		NKX2-5 c.355G>T p.(Ala119Ser)	1		
<b>PKP2</b>	<i>plakophilin 2</i>	PKP2 c.1170+4_1170+7dup	1	3	
		PKP2 c.2552C>T, p.(Thr851Met)	1	3	
		PKP2 p.Val587Ile	1		Benign(3);Likely benign(5);Uncertain significance(2)
<b>PRDM16</b>	<i>PR domain containing 16</i>	PRDM16 c.1484C>T p.(Pro495Leu)	1	3	
		PRDM16 p.Asp418Asn	1		
		PRDM16 p.Phe729Leu	1		Likely benign (1)
<b>PRKAG2</b>	<i>protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit</i>	PRKAG2 c.997T>G p.(Ser333Ala)	1	3	
		PRKAG2 p.Asn512Ile	1		Uncertain significance (1)
		PRKAG2 p.Leu341Ser	1		
<b>PTPN11</b>	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>	PTPN11 c.1492C>T, (p.Arg498Trp)	1	5	Pathogenic (5)
		PTPN11 c.1643C>G p.(Ser548Cys)	1	3	
<b>RAF1</b>	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>	RAF1 c.781C>T, p.(Pro621Ser)	3	5	

		RAF1 c.935T>C p.(Val312Ala)	1		
<b>RBM20</b>	<i>RNA binding motif protein 20</i>	RBM20 p.Ala818Ser	1		Likely benign(2);Uncertain significance(1)
<b>RYR2</b>	<i>ryanodine receptor 2 (cardiac)</i>	RYR2 c.10640C>T p.(Thr3547Met)	1	3	
		RYR2 c.5654G>A p.(Gly1885Glu)	1		
		RYR2 p.Arg3904Trp	1		Uncertain significance (1)
		RYR2 p.Pro3209Leu	1		
<b>SCN10A</b>	<i>Sodium Channel, Voltage Gated, Type 10 Alpha Subunit</i>	SCN10A c.3803G>A, p.(Arg1268Gln)	1	3	
<b>SCN2B</b>	<i>sodium channel, voltage-gated, type II, beta</i>	SCN2B c.332C>T, p.(Ser111Leu)	1	3	
		SCN2B c.53G>A p.Ser18Asn	1	3	
<b>SCN5A</b>	<i>sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit</i>	SCN5A c.1199G>A p.(Gly400Glu)	1		
		SCN5A c.1673A>G, p.(His558Arg)	3		
		SCN5A c.4895G>A p.(Arg1632His)	1	4	
		SCN5A c.5216G>A p.(Arg1739Gln)	1	3	
		SCN5A c.615T>A p.(Tyr205Ter)	1	3	
		SCN5A p.Arg569Trp	1		
		SCN5A p.Glu1876Val	1		
		SCN5A p.His558Arg	1		
		SCN5A p.Pro1044Leu	1		
<b>SNTA1</b>	<i>syntrophin, alpha 1</i>	SNTA1 p.Ala257Gly	1		Likely benign(4);Uncertain significance(1); Pathogenic (1) for long QT syndrome
<b>SOS2</b>	<i>SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2</i>	SOS1 c.233T>G, p.(Phe78Cys)	1	3	
<b>TBX3</b>	<i>T-box 3</i>	TBX3 p.Asp114Asn	1		

<b>TGFB3</b>	<i>transforming growth factor, beta 3</i>	TGFB3 c.293C>T, p.(Ser98Leu)	1		
		TGFB3 c.487C>T p.(Arg163Trp)	2	3	
		TGFB3 p.Arg163Trp	1		Uncertain significance (3)
<b>TMEM43</b>	<i>transmembrane protein 43</i>	TMEM43 p.Arg240Cys	1		Uncertain significance (4)
		TMPO p.Ile530SerfsTer8	1	3	
<b>TNNC1</b>	<i>troponin C type 1 (slow)</i>	TNNC1 c.435C>A p.(Asp145Glu)	2	3	
<b>TNNI3</b>	<i>troponin I type 3 (cardiac)</i>	TNNI3 c.497C>T, p.(Ser166Phe)	1	4	Likely pathogenic(2); Pathogenic(1); Uncertain significance(1)
<b>TNNT2</b>	<i>troponin T type 2 (cardiac)</i>	TNNT2 c.304C>T p.(Arg102Trp)	1	5	
		TNNT2 c.311G>A p.(Arg104His)	1	5	
		TNNT2 c.275G>A, p.(Gly92Glu)	1	4	
		TNNT2 c.304C>T p.(Arg102Trp)	2	4	
		TNNT2 c.824G>A p.(Arg275Gln)	1	3	
		TNNT2 c.862C>T, p.(Arg285Cys)	1	3	
<b>TPM1</b>	<i>tropomyosin 1 (alpha)</i>	TPM1 c.523G>A, p.(Asp175Asn)	1	4	Pathogenic (9)
<b>TRIM63</b>	<i>tripartite motif-containing 63</i>	TRIM63 c.481_482delAG p.(Ser161Cysfs*8) HOM	1	3	
		TRIM63 c.831+2T>G	1	3	
		TRIM63 p.Gln247Ter	1	3	Likely pathogenic(1);Uncertain significance(1)
<b>TXNRD2</b>	<i>thioredoxin reductase 2</i>	TXNRD2 c.528 + 2T>C	1	3	
<b>VCL</b>	<i>vinculin</i>	VCL p.Arg759Gln	1	3	Uncertain significance (1)

Publikováno (Bonaventura *et al.* 2019)

**Tab. 10.** Kompletní seznam všech vyšetřovaných genů. Názvy genů v originálním znění.

<b>Gen</b>	<b>Originální název</b>
ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9
ABCG5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5
ABCG8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
ACTA1	actin, alpha 1, skeletal muscle
ACTA2	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
ACTC1	actin, alpha, cardiac muscle 1
ACTN2	actinin, alpha 2
AGL	amylase-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransferase
AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9
ALMS1	Alstrom syndrome 1
ANK2	ankyrin 2, neuronal
ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)
APOA4	apolipoprotein A-IV
APOA5	apolipoprotein A-V
APOB	apolipoprotein B (including Ag(x) antigen)
APOC2	apolipoprotein C-II
APOE	hypothetical LOC100129500; apolipoprotein E
ATP5E	ATP Synthase F1 Subunit Epsilon
ATG5	Autophagy Related 5
BAG3	BCL2-associated athanogene 3
BECN1	Beclin 1, Autophagy Related
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CACNA1C	calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit
CACNA2D1	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1
CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit
CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)
CALM2	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)
CALR3	calreticulin 3
CAPN1	Calpain 1, (Mu/I) Large Subunit
CASQ2	calsequestrin 2 (cardiac muscle)

CAV3	caveolin 3
CBL	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
CBS	cystathionine-beta-synthase
CETP	cholesteryl ester transfer protein, plasma
COA5	Cytochrome C Oxidase Assembly Factor 5
COL3A1	collagen, type III, alpha 1
COL5A1	collagen, type V, alpha 1
COL5A2	collagen, type V, alpha 2
COX15	COX15 homolog, cytochrome c oxidase assembly protein (yeast)
CREB3L3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3
CRELD1	cysteine-rich with EGF-like domains 1
CRYAB	crystallin, alpha B
CSRP3	cysteine and glycine-rich protein 3 (cardiac LIM protein)
CTF1	cardiotrophin 1
CTNNA3	catenin (cadherin-associated protein), alpha 3
DES	desmin
DMD	dystrophin
DMPK	dystrophia myotonica-protein kinase
DNAJC19	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C19
DNM1L	dynamamin 1-like
DOLK	dolichol kinase
DPP6	dipeptidyl-peptidase 6
DSC2	desmocollin 2
DSG2	desmoglein 2
DSP	desmoplakin
DTNA	dystrobrevin, alpha
EFEMP2	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
ELN	elastin
EMD	emerin
EMILIN1	elastin microfibril interfacier 1
EYA4	eyes absent homolog 4 (Drosophila)
FBN1	fibrillin 1
FBN2	fibrillin 2
FHL1	four and a half LIM domains 1
FHL2	four and a half LIM domains 2

FKRP	fukutin related protein
FKTN	fukutin
FLNA	filamin A
FLNC	filamin C
FOXE3	forkhead box E3
FOXRED1	FAD-dependent oxidoreductase domain containing 1
FXN	frataxin
GAA	glucosidase, alpha; acid
GATAD1	GATA zinc finger domain containing 1
GATA4	GATA Binding Protein 4
GCKR	glucokinase (hexokinase 4) regulator
GJA1	gap junction protein alpha 1
GJA5	gap junction protein, alpha 5, 40kDa
GLA	galactosidase, alpha
GLB1	galactosidase, beta 1
GPD1L	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like
GPIHBP1	glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1
GUSB	glucuronidase, beta
HADHA	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, alpha subunit
HCN4	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4
HFE	hemochromatosis
HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HSPA4	heat shock protein family A (Hsp70) member 4; Heat Shock 70kDa Protein 4
HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1; Heat Shock 27kDa Protein 1
HSPB8	heat shock 22kDa protein 8
ILK	integrin-linked kinase
ITGB1BP2	Integrin Beta 1 Binding Protein (Melusin) 2
IRX4	Iroquois Homeobox Protein 4
JAG1	jagged 1 (Alagille syndrome)
JPH2	junctionophilin 2
JUP	junction plakoglobin
KCNA5	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5
KCND3	potassium voltage-gated channel, Shal-related subfamily, member 3
KCNE1	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1
KCNE1L	KCNE1-like

KCNE2	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 2
KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3
KCNH2	potassium voltage-gated channel, subfamily H, member 2
KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
KCNJ5	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 5
KCNJ8	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 8
KCNQ1	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1
KLF10	Kruppel-like factor 10
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAMA2	laminin, alpha 2
LAMA4	laminin, alpha 4
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2
LDB3	LIM domain binding 3
LDLR	low density lipoprotein receptor
LDLRAP1	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1
LMF1	lipase maturation factor 1
LMNA	lamin A/C
LMOD1	leiomodulin 1
LOX	lysyl oxidase
LPL	lipoprotein lipase
LTBP2	latent transforming growth factor beta binding protein 2
MAP2K1	mitogen-activated protein kinase kinase 1
MAP2K2	mitogen-activated protein kinase kinase 2 pseudogene
MAT2A	methionine adenosyltransferase 2A
MDM2	MDM2 Proto-Oncogene, E3 Ubiquitin Protein Ligase
MED12	mediator complex subunit 12
MFAP5	microfibrillar associated protein 5
MIB1	mindbomb homolog 1 (Drosophila)
MRPL3	mitochondrial ribosomal protein L3
MURC	muscle-related coiled-coil protein
MYBPC3	myosin binding protein C, cardiac
MYH11	myosin, heavy chain 11, smooth muscle
MYH6	myosin, heavy chain 6, cardiac muscle, alpha
MYH7	myosin, heavy chain 7, cardiac muscle, beta
MYL2	myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow

MYL3	myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow
MYLK	myosin light chain kinase
MYLK2	myosin light chain kinase 2
MYO6	myosin VI
MYOM1	myomesin 1, 185kDa
MYOZ2	myozenin 2
MYPN	myopalladin
NEBL	nebulette
NEXN	nexilin (F actin binding protein)
NKX2-5	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila)
NODAL	nodal homolog (mouse)
NOS1AP	nitric oxide synthase 1 (neuronal) adaptor protein
NOTCH1	Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)
NPPA	natriuretic peptide precursor A
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PDLIM3	PDZ and LIM domain 3
PKP2	plakophilin 2
PLN	phospholamban
PLOD1	procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1
PRDM16	PR domain containing 16
PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I
PRKAG2	protein kinase, AMP-activated, gamma 2 non-catalytic subunit
PRKAR1A	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
PSEN1	presenilin 1
PSEN2	presenilin 2 (Alzheimer disease 4)
PTPN11	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
RAF1	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
RANGRF	RAN guanine nucleotide release factor
RBM20	RNA binding motif protein 20
RIT1	Ras-Like Without CAAX 1
RRAS	Related RAS Viral (R-Ras) Oncogene Homolog
RYR1	ryanodine receptor 1 (skeletal)
RYR2	ryanodine receptor 2 (cardiac)
SALL4	Spalt-Like Transcription Factor 4



SCN1B	sodium channel, voltage-gated, type I, beta
SCN2B	sodium channel, voltage-gated, type II, beta
SCN3B	sodium channel, voltage-gated, type III, beta
SCN4B	sodium channel, voltage-gated, type IV, beta
SCN5A	sodium channel, voltage-gated, type V, alpha subunit
SCN10A	Sodium Channel, Voltage Gated, Type X Alpha Subunit
SCO2	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)
SDHA	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
SEPN1	selenoprotein N, 1
SGCB	sarcoglycan, beta (43kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SGCD	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SGCG	sarcoglycan, gamma (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SHOC2	soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)
SKI	SKI proto-oncogene
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3
SLC25A4	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4
SLC2A10	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10
SLMAP	sarcolemma associated protein
SMAD2	SMAD family member 2
SMAD3	SMAD family member 3
SMAD4	SMAD family member 4
SNTA1	syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, acidic component)
SOS1	son of sevenless homolog 1 (Drosophila)
SOS2	SOS Ras/Rho guanine nucleotide exchange factor 2
SPRED1	sprouty-related, EVH1 domain containing 1
STUB1	STIP1 Homology And U-Box Containing Protein 1, E3 Ubiquitin
SYNE1	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2
TAZ	tafazzin
TBX20	T-box 20
TBX3	T-box 3
TBX5	T-box 5
TCAP	titin-cap (telethonin)
TGFB2	transforming growth factor, beta 2

TGFB3	transforming growth factor, beta 3
TGFBR1	transforming growth factor, beta receptor 1
TGFBR2	transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa)
TMEM43	transmembrane protein 43
TMEM70	transmembrane protein 70
TMPO	thymopoietin
TNNC1	troponin C type 1 (slow)
TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)
TNNT2	troponin T type 2 (cardiac)
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
TRDN	triadin
TRIM54	Tripartite Motif Containing 54
TRIM63	tripartite motif-containing 63
TRPM4	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 4
TSFM	Ts translation elongation factor, mitochondrial
TTN	titin
TTR	transthyretin
TXNRD2	thioredoxin reductase 2
UBE4B	Ubiquitination Factor E4B
UNC45B	Unc-45 Myosin Chaperone B
VCL	vinculin
XK	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)
ZBTB17	zinc finger and BTB domain containing 17
ZFPM2	Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2
ZHX3	zinc fingers and homeoboxes 3
ZIC3	Zic family member 3 (odd-paired homolog, Drosophila)

Publikováno (Bonaventura *et al.* 2019)

**Tab. 11.** Seznam složených heterozygotů a pacientů s komplexním genotypem. Klasifikace ACMG uváděna od 3. třídy (VUS) do 5. třídy (patogenní).

### Složení heterozygoti

Pacient	Změna na úrovni nukleotidu a proteinu	ACMG	Změna na úrovni nukleotidu a proteinu	ACMG
R.D.	<i>MYH7</i> c.2389G>A p.(Ala797Thr)	5	<i>MYH7</i> c.161G>A p.(Arg54Gln)	3
	<i>DSP</i> c.8068C>A p.(Pro2690Thr)	3	<i>SCN2B</i> c.53G>A p.Ser18Asn	3
P.S.	<i>MYBPC3</i> c.2639_2642dup, p.(Ser882Argfs*3)	5	<i>MYBPC3</i> c.1468G>A, p.(Gly490Arg)	3
J.Š.	<i>MYBPC3</i> c.696del, p.(Phe233Serfs*67)	5	<i>MYBPC3</i> c.2381C>T, p.(Pro794Leu)	3

### Pacienti s komplexním genotypem

Pacient	Změna na úrovni nukleotidu a proteinu	ACMG	Změna na úrovni nukleotidu a proteinu	ACMG
R.D.	<i>MYH7</i> c.2389G>A p.(Ala797Thr)	5	<i>MYH7</i> c.161G>A p.(Arg54Gln)	3
	<i>DSP</i> c.8068C>A p.(Pro2690Thr)	3	<i>SCN2B</i> c.53G>A p.Ser18Asn	3
J.N.	<i>MYBPC3</i> c.3166dup p.(Ala1056Glyfs*9)	5	<i>MYH7</i> c.5527A>G p.(Ser1843Gly)	3
	<i>ACTN2</i> c.1549C>T p.(Leu517Phe)	3		
M.Ž.	<i>MYBPC3</i> c.3697C>T, p.(Gln1233*)	5	<i>MYH7</i> c.2039C>T p.(Ser680Phe)	3
	<i>DSP</i> c.242G>A p.(Cys81Tyr)	3		
V.N.	<i>MYBPC3</i> c.2215G>T p.(Glu739*)	5	<i>TNNC1</i> c.435C>A p.(Asp145Glu)	3
	<i>PKP2</i> c.1170+4_1170+7dup	3		
P.V.	<i>RAF1</i> c.781C>T, p.(Pro621Ser)	5	<i>MYBPC3</i> c.3343G>A, p.(Val1115Ile)	3
	<i>SOS1</i> c.233T>G, p.(Phe78Cys)	3		
A.P.	<i>MYL2</i> c.401A>C p.(Glu134Ala)	3	<i>MYH7</i> c.1868A>G p.(Asn623Ser)	3
	<i>CAV3</i> c.89A>G p.(Lys30Arg)	3		
J.J.	<i>MIB1</i> c.1111C>T p.(Arg371*)	3	<i>MYL2</i> c.496G>A p.(Asp166Asn)	3
	<i>RYR2</i> c.10640C>T p.(Thr3547Met)	3		
E.K.	<i>MYH7</i> c.2167C>G p.(Arg723Gly)	5	<i>ELN</i> c.1408C>T p.(Gln470*)	4*
M.K.	<i>MYBPC3</i> c.3697C>T, p.(Gln1233*)	5	<i>MYOZ2</i> c.343C>T, p.(Arg115*)	3
E.K.	<i>MYH7</i> c.2770G>A p.(Glu924Lys)	5	<i>CRYAB</i> c.116C>T p.(Pro39Leu)	3
R.Š.	<i>MYBPC3</i> c.3490+1G>T	5	<i>ACTN2</i> c.2147C>T, p.(Thr716Met)	3
R.Š.	<i>MYBPC3</i> c.3490+1G>T	5	<i>ACTN2</i> c.2147C>T, p.(Thr716Met)	3
L.H.	<i>MYBPC3</i> c.3580dup p.(Ala1194Glyfs*14)	5	<i>FHL2</i> c.467A>T p.(Lys156Ile)	3
P.V.	<i>RAF1</i> c.781C>T, p.(Pro621Ser)	5	<i>MYBPC3</i> c.3343G>A, p.(Val1115Ile)	3
J.N.	<i>MYBPC3</i> c.3166dup p.(Ala1056Glyfs*9)	5	<i>MYH7</i> c.5527A>G p.(Ser1843Gly)	3
L.F.	<i>MYBPC3</i> c.772+1G>A	5	<i>PRDM16</i> c.1484C>T p.(Pro495Leu)	3
P.M.	<i>MYH7</i> c.2207T>C p.(Ile736Thr)	5	<i>PRKAG2</i> c.997T>G p.(Ser333Ala)	3
V.N.	<i>MYBPC3</i> c.2215G>T p.(Glu739*)	5	<i>TNNC1</i> c.435C>A p.(Asp145Glu)	3

I.Š.	<i>MYH7</i> c.2546T>C p.(Met849Thr)	4	<i>DSC2</i> c.1223C>T p.(Thr408Ile)	3
P.P.	<i>MYH7</i> c.428G>A p.(Arg143Gln)	4	<i>SCN10A</i> c.3803G>A, p.(Arg1268Gln)	3
L.P.	<i>MYH7</i> c.2333A>T p.(Asp778Val)	4	<i>SCN5A</i> c.615T>A p.(Tyr205Ter)	3
J.P.	<i>TNNT2</i> c.824G>A p.(Arg275Gln)	3	<i>SCN5A</i> c.4895G>A p.(Arg1632His)	4**
R.V	<i>MYH7</i> c.5561C>T, p.(Thr1854Met)	3	<i>TNNT3</i> c.497C>T, p.(Ser166Phe)	4
M.L.	<i>TRIM63</i> c.831+2T>G	3	<i>TRIM63</i> p.Gln247Ter	3
P.T.	<i>MYBPC3</i> c.442G>A p.(Gly148Arg)	3	<i>ACTN2</i> c.1552C>T p.(His518Tyr)	3
V.F.	<i>MYOM1</i> c.1482T>G p.(Ser494Arg)	3	<i>BAG3</i> c.1523A>G p.(Tyr508Cys)	3
J.B.	<i>SCN2B</i> c.332C>T, p.(Ser111Leu)	3	<i>CACNA1C</i> c.5693+2T>A	3
V.B.	<i>MYH7</i> c.2882T>G, p.(Leu961Arg)	3	<i>DSG2</i> c.216G>T, p.(Lys72Asn)	3
J.M.	<i>NEXN</i> c.1190G>A, p.(Arg397Gln)	3	<i>DSP</i> c.2684A>G, p.(Tyr895Cys)	3
Z.M.	<i>MYH7</i> c.2347C>T, p.(Arg783Cys)	3	<i>DSP</i> c.4961T>C, p.(Leu1654Pro)	3
J.N.	<i>DSP</i> c.3616T>A p.(Leu1206Ile)	3	<i>FLNC</i> c.4660A>C p.(Ile1554Leu)	3
S.V.	<i>MYH6</i> c.3607dup p.(Ala1203Glyfs*30)	3	<i>MIB1</i> c.1971del p.(Asn658Thrfs*7)	3
I.L.	<i>FHL2</i> c.501+1G>T	3	<i>MYBPC3</i> c.1736A>C p.(Lys579Thr)	3
A.H.	<i>MYH7</i> c.497T>G p.(Leu166Glu)	3	<i>MYBPC3</i> c.62T>G p.(Val21Gly)	3
L.J.	<i>MYBPC3</i> c.1468G>A p.(Gly490Arg)	3	<i>MYH6</i> c.3346C>A p.(Arg1116Ser)	3
J.J.	<i>MIB1</i> c.1111C>T p.(Arg371*)	3	<i>MYL2</i> c.496G>A p.(Asp166Asn)	3
N.S.	<i>MYBPC3</i> c.1000G>A p.(Glu334Lys)	3	<i>MYOM1</i> c.1175-2A>T	3
J.S.	<i>MYBPC3</i> c.1790G>A p.(Arg597Gln)	3	<i>SCN5A</i> c.1199G>A p.(Gly400Glu)	3

Publikováno (Bonaventura et al. 2019)

Vysvětlivky:

\* pravděpodobně patogenní mutace v genu pro elastin, v ClinVar dosud nereportována, bez jasného vztahu k HCM, v literatuře popsána asociace genu se supraaortální stenózou (Jelsig *et al.*, 2017), kterou tato pacientka neměla diagnostikovánu, jednalo se o jasný fenotyp HCM, podkladem je mutace MYH7 a segreguje v rodině

\*\* Třída 4 (pravděpodobně patogenní) platí v tomto případě pro „sick sinus syndrom“, nikoli HCM

Celkem 72 variant u 70 (21 %) HCM pacientů bylo klasifikováno jako P/LP a jsou uvedeny v Tab. 12 a Obr. 6., jejich distribuce pak v Tab. 13.

**Tab. 12.** Klasifikace variant podle ACMG guidelines.

Gen	Benigni/pravděpodobně benigní	VUS	P/LP	celkem
MYBPC3	34	8	42	84
MYH7	15	8	14	37
SCN5A	10	0	1	11
TNNT2	3	2	5	10
DSP	8	1	0	9
ACTN2	7	1	0	8
CSRP3	1	6	0	7
MYH6	5	1	0	6
MYOM1	1	3	0	4
RAF1	1	0	3	4
DSG2	3	0	0	3
MYL2	3	0	0	3
CACNA1C	2	1	0	3
GLA	0	0	2	2
NEBL	0	2	0	2
MYL3	0	0	2	2
TNNI3	0	0	1	1
TPM1	0	0	1	1
PTPN11	0	0	1	1

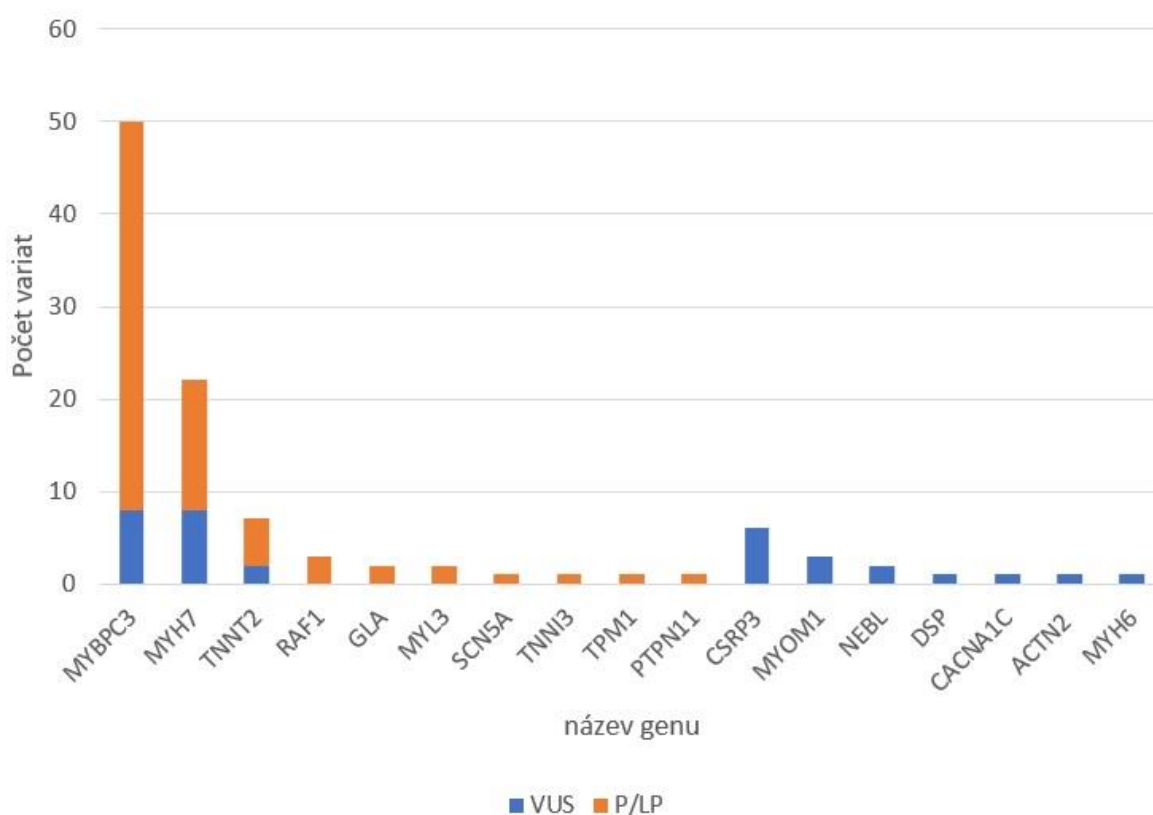
Publikováno (Bonaventura *et al.* 2019)

**Tab. 13.** Distribuce variant u pacientů.

		Nález variant u jednotlivých pacientů				
ACMG	Klasifikace variant	1.	2.	3.	4.	celkem
Třída 5	patogenní	53	0	0	0	53
Třída 4	pravděpodobně patogenní	17	2	0	0	19
Třída 3	VUS	70	33	8	2	113
Třída 2	pravděpodobně benigní	13	14	3	0	30
Třída 1	benigní	2	2	0	1	5

Publikováno (Bonaventura *et al.* 2019)

Nejčastěji byly varianty nalezeny v genech *MYBPC3* a *MYH7*, přičemž gen *MYBPC3* (58 %) hraje mezi P/LP variantami zcela dominantní roli (Obr.6).



**Obr. 6.** Nalezené varianty a jejich klasifikace. (Bonaventura *et al.* 2019)

Celkem 7 P/LP variant bylo nalezeno v nesarkomerických genech *RAF1*, *SCN5A*, *GLA* a *PTPN11* (Tab. 12). V ostatních nesarkomerických genech byly nalézány pouze VUS. Složení heterozygoti pro P/LP mutace nebyli identifikováni, komplexní genotypy u 38 pacientů byly tvořeny převážně VUS (Tab. 11)

## 4.2 Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem

Pacienti s nalezenou P/LP variantou jsou označeni jako pozitivní genotyp (G+). Ostatní pacienti včetně VUS jsou považováni za negativní genotyp (G-). Charakteristika souboru pacientů a porovnání klinických a echokardiografických ukazatelů mezi G+ a G- pacienty je uvedena v Tab. 14.

**Tab. 14.** Porovnání pacientů s pozitivním (G+) a negativním (G-) genotypem

	<b>G+</b>	<b>G-</b>	<b>p hodnota</b>
<b>Počet (%)</b>	70 (21)	266 (79)	
Věk v době diagnózy, roky	44.5 ± 15.6	55.6 ± 13.9	< 0.01
Ženské pohlaví, <i>n</i> (%)	26 (37)	113 (42)	0.42
Rodinná anamnéza HCM, <i>n</i> (%)	15 (21)	22 (8)	0.04
Rodinná anamnéza SCD, <i>n</i> (%)	6 (9)	10 (4)	0.75
Arteriální hypertenze, <i>n</i> (%)	18 (25)	138 (52)	< 0.01
MLVWT (mm)	20.7 ± 4.5	19.6 ± 4.6	0.43
Tvar IVS, <i>n</i> (%)			
Sigmoidní	11 (16)	86 (32)	0.01
Reverzní	28 (40)	64 (24)	0.01
Neutrální	29 (41)	110 (41)	> 0.99
Apikální forma HCM	2 (3)	5 (2)	0.64
Obstrukce, <i>n</i> (%)	50 (71)	180 (53)	< 0.01
LVOT gradient (mmHg)	77.8 ± 10.9	76.6 ± 5.3	0.92

Vysvětlivky: SCD – náhlá srdeční smrt, MLVWT – maximální tloušťka stěny levé komory, IVS – interventrikulární septum, LVOT – výtokový trakt levé komory

G+ pacienti jsou v průměru o 11.1 let mladší a mají méně často arteriální hypertenzi. Je u nich též více než 2x častější rodinná anamnéza HCM. U G+ pacientů při echokardiografickém vyšetření častěji nalézáme reversní typ IVS než u G- pacientů. Výskyt sigmoidního tvaru IVS je 2x častější u G- pacientů.

### 4.3 Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření

Jak je patrné z Tab. 13, celkem 188 identifikovaných variant u 142 (42 %) HCM pacientů bylo klasifikováno jako P/LP nebo VUS. Rozdělení pacientů podle klasifikace nalezených variant a hodnoty Mayo Score je uvedeno v Tab. 15.

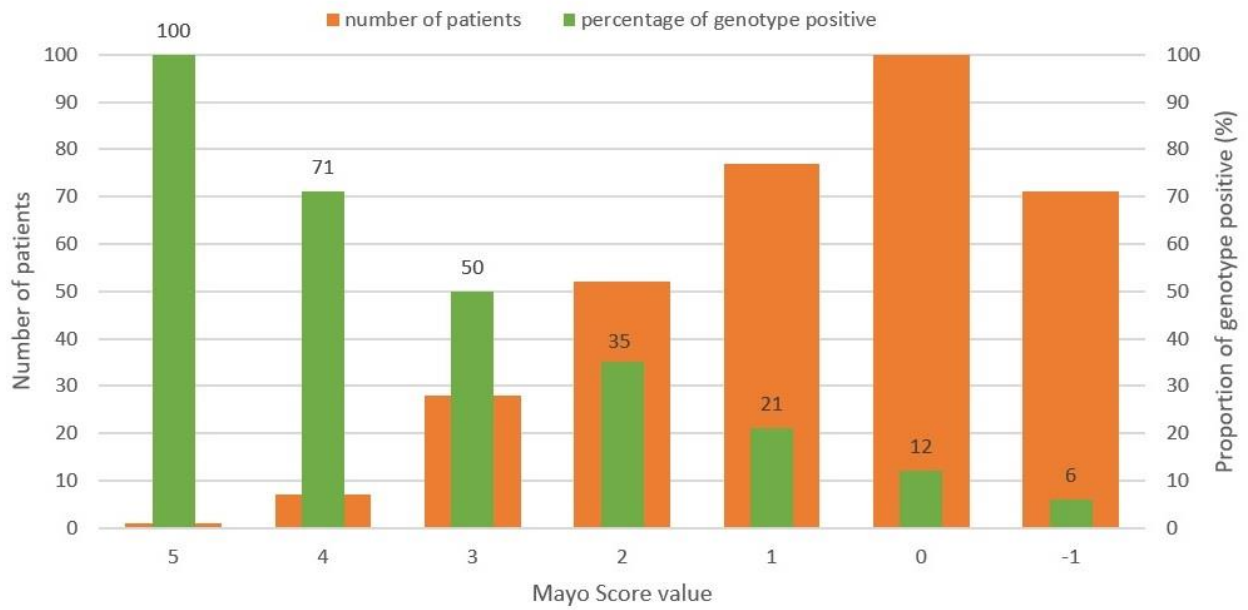
**Tab. 15.** Rozdělení pacientů podle klasifikace nalezených variant a hodnoty Mayo Score.

<b>Mayo Score</b>	<b>Počet pacientů</b>	<b>P/LP varianta (%)</b>	<b>P/LP + VUS (%)</b>
5	1	1 (100)	1 (100)
4	7	5 (71)	5 (71)
3	28	14 (50)	16 (57)
2	52	18 (35)	29 (56)
1	77	16 (21)	39 (50)
0	100	12 (12)	31 (31)
-1	71	4 (6)	21 (30)

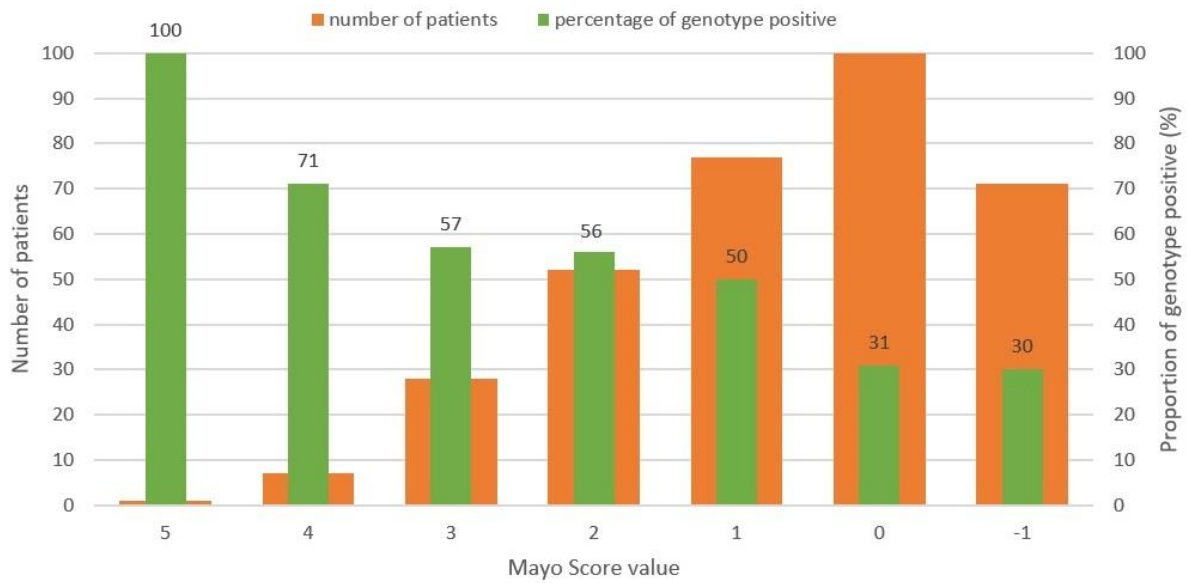
Pro hodnocení výtěžnosti jsme provedli dvě analýzy. První analýza zahrnuje pouze P/LP varianty a druhá analýza zahrnuje i VUS. Jeden pacient dosáhl nejvyššího Mayo Score (5) a měl nalezenou patogenní mutace (100% výtěžnost). Pacienti s Mayo Score 4 měli záchyt patogenní mutace v 71 % případů. U pacientů s Mayo Score od -1 do 1 byla výtěžnost molekulárně genetického vyšetření velmi nízká (6 – 21 %) (Tab. 15 a Obr. 7).

Druhá analýza výtěžnosti počítá s možností, že jsou kromě P/LP variant i VUS považovány za pozitivní genotyp. I v tomto případě výtěžnost zcela koreluje s hodnotami Mayo Score (Tab. 15, Obr. 8).





**Obr. 7.** Mayo Score a pozitivní genotyp (pouze P/LP varianty) u HCM pacientů.



**Obr. 8.** Mayo Score a pozitivní genotyp (P/LP varianty a VUS) u HCM pacientů.

#### 4.4 Kaskádovité vyšetřování příbuzných

Kromě základní kohorty nepříbuzných pacientů jsme u prvostupňových příbuzných probandů, kteří měli zájem o genetický screening, provedli molekulárně genetické vyšetření. Příklad kaskádovitého genetického screeningu ukazujeme na kasuistice rodiny, kde se podařilo dokonale kompletizovat data, stanovit typ dědičnosti i molekulárně genetickou příčinu HCM. Dále se podařilo vysvětlit i dva zavádějící výsledky z molekulárně genetické analýzy.

Probandka ZH, ročník narození 1969, navštívila naši ambulanci HCM v prosinci 2016 v rámci screeningu příbuzných po náhlém úmrtí matky (HF, zemřela ve věku 51 let, sekčně diagnostikována HCM). U pacientky ZH byla echokardiograficky jednoznačně diagnostikována HCM (šíře IVS 18 mm), bez obstrukce i po aplikaci isosorbid-dinitrátu (ISDN) v kombinaci s Valsalvovým manévrem. Pacientka měla dobrou systolickou funkci LK s EF 70 %. V únoru 2019 byla v rámci pravidelné rizikové stratifikace při vyšetření Holter EKG u pacientky odhalena epizoda nesetrválé komorové tachykardie. Kromě rodinné anamnézy náhlé srdeční smrti a dilatace levé síně se jednalo o další rizikový faktor náhlé srdeční smrti (SCD). Byla provedena kalkulace ESC rizika (Elliott *et al.*, 2014; O'Mahony *et al.*, 2018) náhlé srdeční smrti (SCD); odhad činil 6,59 % za 5 let, tj. vysoké riziko. Pacientce byla proto nabídnuta implantace kardioverter-defibrilátoru (ICD). Po souhlasu pacientky byl ICD za krátké hospitalizace na naší klinice úspěšně implantován ještě týž měsíc. Vzhledem k rodinné anamnéze bylo provedeno u pacientky molekulárně genetické vyšetření naším studijním panelem 229 genů s následujícím výsledkem:

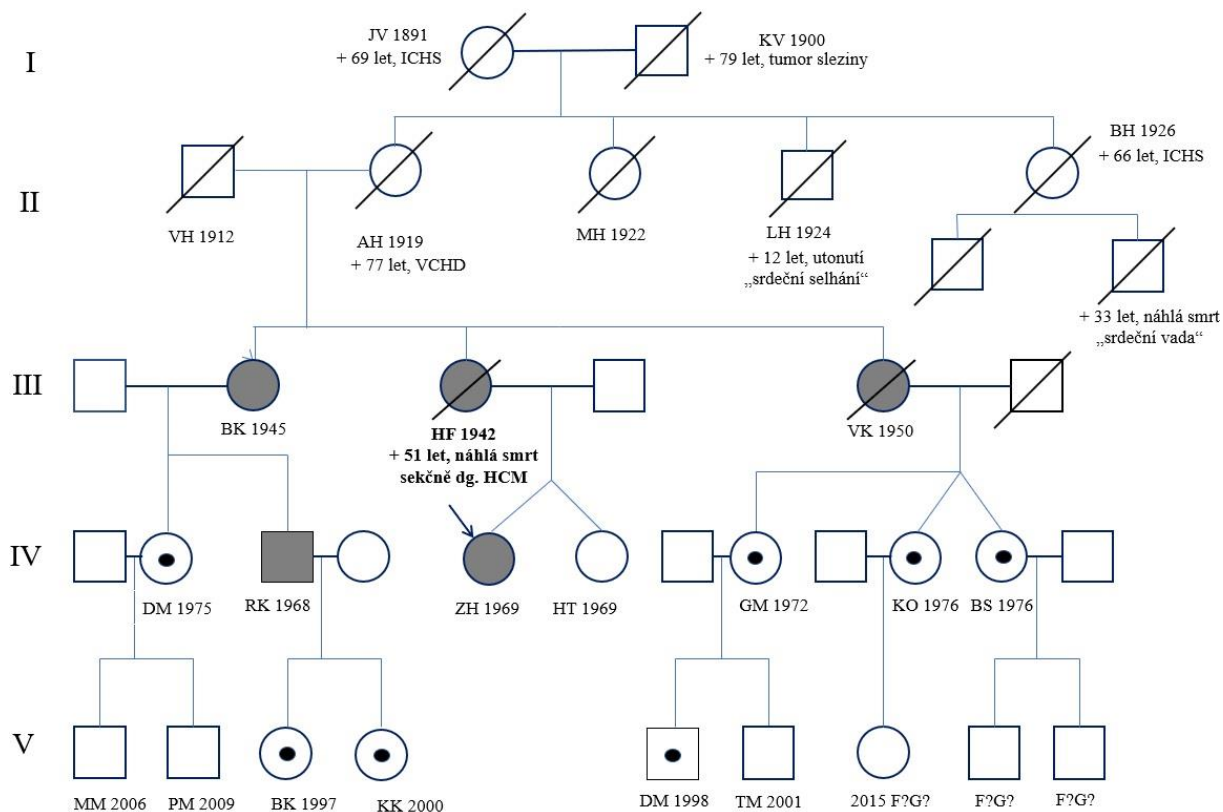
MYBPC3:c.3697C>T p.(Gln1233\*) - patogenní

SCO2:c.418G>A p.(Glu140Lys) - patogenní

TTN:c.31763-1G>A (intron, splice site) – VUS

Nomenklatura dle Human Genome Variation Society (den Dunnen *et al.*, 2016), v závorce uveden vliv mutace na stavbu polypeptidového řetězce.

Postupně byl prováděn klinický screening příbuzných (fyzikální vyšetření, EKG, echokardiografie) a většina z nich souhlasila s cíleným molekulárně genetickým vyšetřením. Cíleně byl u všech příbuzných vyšetřován gen *MYBPC3* již klasickou Sangerovou metodou. Kompletní rodokmen prezentujeme na Obr. 9.



**Obr. 9.** Rodokmen.

Pacienti s HCM jsou označeni standardním značením postižených jedinců (tmavá výplň), nosiči patogenní mutace *MYBPC3* bez fenotypu HCM jsou označeni standardním značením přenašečů (tečka uprostřed). „F“ značí fenotyp, „G“ genotyp.

Poté byl cíleně vyšetřen gen *TTN*, jehož varianta byla označena jako VUS. Byla vyšetřena sestra probandky, na vlastní žádost všechny sestřenice probandky a teta B.K. (Obr. 9) s následujícím výsledkem:

ZH 1969 - heterozygot pro mutaci *TTN*:c.31763-1G>A

HT 1969 - heterozygot pro mutaci *TTN*:c.31763-1G>A

BS 1976 - zdravý homozygot

BK 1945 - zdravý homozygot

KO 1976 - zdravý homozygot

DM 1975 - zdravý homozygot

Je patrné že VUS v genu *TTN* nesegreguje s fenotypem. Teta s fenotypem HCM (BK 1945) nenese variantu v *TTN*. Nositelka této varianty (HT 1969) bez fenotypu HCM je navíc

dizygotním dvojčetem probandky, tato informace je pro další klasifikaci varianty v genu *TTN* velmi cenná. Variantu genu *TTN* nyní považujeme za pravděpodobně benigní.

Varianta v genu *SCO2* byla laboratoří označena jako patogenní. Jedná se o mutaci způsobující deficit cytochrom c oxidázy. Dědičnost je autosomálně recesivní, za patogenní ji lze tedy považovat jen v případě, že by byla varianta nalezena na obou alelách. Způsobuje vzácnou formu kardioencefalomyopatie, která je obvykle fatální v prvním roce života. Je provázána těžkou svalovou hypotonií, poruchou růstu, ztrátou neuronů v basálních gangliích, mozkovém kmeni a míše, laktátovou acidózou a hypertrofickou kardiomyopatií (Papadopoulou *et al.*, 1999). Nic z výše uvedeného v naší rodině pozorováno nebylo.

Nikdo ze zemřelých pacientů nebyl post mortem molekulárně geneticky vyšetřen. V I. generaci lze tedy pouze předpokládat, že jeden z rodičů nesl mutovanou alelu pro *MYBPC3*. Z rodokmenu (Obr. 9) je zřejmá pro HCM typická AD dědičnost s neúplnou penetrancí a variabilní expresivitou. V I. generaci se pacienti dožili (v soudobém měřítku) vysokého věku. Ve II. generaci již došlo u 12letého chlapce k náhlému úmrtí utonutím při „srdeční vadě“ a minimálně 2 jeho sourozenci byli pravděpodobní nosiči patogenní mutace. Ve III. generaci dochází k náhlému úmrtí u mladého muže věku 33 let na „srdeční vadu“, podrobnosti probandka ani nikdo jiný z rodiny nemá k dispozici. Při dalším náhlém úmrtí ve III. generaci (matka probandky) s následnou jednoznačnou diagnostikou HCM při pitvě se probandka rozhoduje pro konzultaci na naší klinice. Na této kasuistice jsme chtěli demonstrovat situaci, kdy screeningové vyšetření probandky na základě rodinné anamnézy náhlého úmrtí má za následek několik preventivních opatření, která diskutujeme v kapitole 5.4.

#### 4.5 Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace

Do studie bylo zařazeno 129 pacientů, kteří podstoupili ASA. Jejich základní charakteristiky jsou shrnuty v níže uvedené tabulce. Jako G+ jsou označeni pacienti s nálezem P/LP mutace. Při nálezu VUS a benigních variant jsou pacienti považováni za G-.

**Tab. 16.** Základní charakteristiky pacientů před a po ASA, rozdělení na skupiny G+ a G-.

	G + (n=30)	G- (n=99)	p hodnota
Mužské pohlaví (%)	19 (63)	46 (46)	0.10
Věk v době provedení ASA, roky	47.3 ± 12.3	58.8 ± 11.3	< 0.01

LVEF před ASA, %	78.7 ± 5.6	79.4 ± 5.7	0.48
LVEF follow-up, %	70.3 ± 9.3	72.5 ± 7.3	0.34
LVEDD před ASA, mm	40.1 ± 4.9	43.6 ± 4.6	< 0.01
LVEDD follow-up, mm	45.6 ± 4.8	47.2 ± 4.7	0.11
Angina pectoris, CCS třída, před ASA	1.9 ± 1.2	1.3 ± 1.0	0.46
Angina pectoris, CCS třída, follow-up	0.2 ± 0.5	0.4 ± 0.7	0.36
Dušnost, NYHA třída, před ASA	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.5	0.81
Dušnost, NYHA třída, follow-up	1.4 ± 0.6	1.4 ± 0.5	0.99
Synkopa, počet epizod, před ASA (%)	4 (13)	14 (14)	0.99
Synkopa, počet epizod, follow-up (%)	1 (3)	13 (13)	0.19
Tloušťka IVS před ASA, mm	23.9 ± 5.0	20.3 ± 3.6	< 0.01
Tloušťka IVS follow-up, mm	15.5 ± 4.0	13.0 ± 4.0	< 0.01
LVOTO před ASA, mmHg	63.6 ± 31.4	63.5 ± 40.2	0.50
LVOTO follow-up, mmHg	16.9 ± 15.7	16.3 ± 18.8	0.73
Trvalý kardiostimulátor před ASA	2 (7)	4 (4)	0.62
ICD před ASA	2 (7)	3 (3)	0.33

Publikováno (Bonaventura *et al.*, 2020)

Vysvětlivky: LVEF – ejekční frakce levé komory, LVEDD – enddiastolický rozměr levé komory, NYHA – New York Heart Association, CCS – Canadian Cardiovascular Society, IVS – mezikomorové septum, LVOTO – obstrukce výtokového traktu levé komory, ICD – implantabilní kardioverter-defibrilátor

Pacienti s pozitivním genotypem byli oproti G- pacientům léčeni ASA v nižším věku ( $47.3 \pm 12.3$  let vs.  $58.8 \pm 11.3$  let,  $p < 0.01$ ), měli výraznější hypertrofii IVS ( $23.9 \pm 5.0$  mm vs.  $20.3 \pm 3.6$  mm,  $p < 0.01$ ), a menší enddiastolický rozměr LK ( $40.1 \pm 4.9$  mm vs.  $43.6 \pm 4.6$  mm,  $p < 0.01$ ).

Před léčbou ASA měly obě skupiny pacientů podobné tlakové gradienty v LVOT ( $63.6 \pm 31.4$  mm Hg vs.  $63.5 \pm 40.2$  mm Hg,  $p = 0.50$ ) i symptomy (NYHA třída  $2.77 \pm 0.57$  vs.  $2.81 \pm 0.49$ ,  $p = 0.81$ ; CCS třída  $1.93 \pm 1.17$  vs.  $1.83 \pm 1.04$ ,  $p = 0.46$ ).

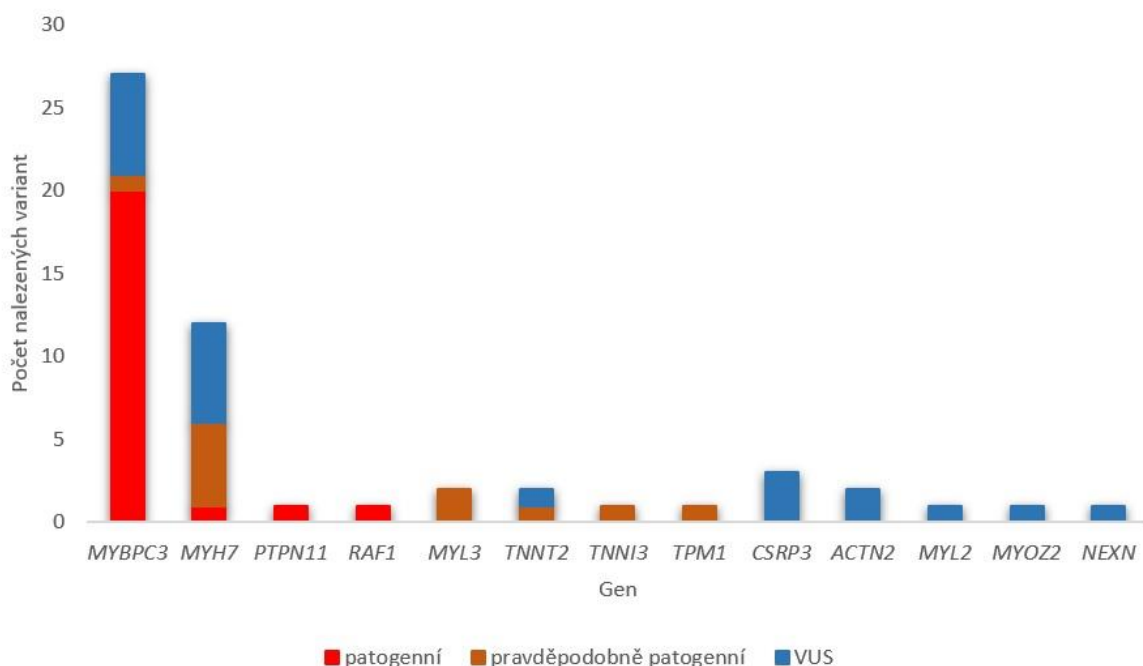
Po 3 měsících od provedení ASA měly obě skupiny pacientů podobné tlakové gradienty v LVOT ( $16.9 \pm 15.7$  mm Hg u G+ vs.  $16.3 \pm 18.8$  mm Hg u G-,  $p = 0.73$ ) i symptomy (NYHA třída  $1.40 \pm 0.62$  vs.  $1.37 \pm 0.53$ ,  $p = 0.99$ , CCS třída  $0.23 \pm 0.52$  vs.  $0.36 \pm 0.65$ ,  $p = 0.36$ ).

U 53 (41 %) ASA pacientů jsme identifikovali 68 genetických variant v 25 různých genech. Kompletní seznam je uveden v tabulce.

**Tab. 17.** Postižené geny a klasifikace variant u ASA pacientů

<b>Gen</b>	<b>P</b>	<b>LP</b>	<b>VUS</b>
<i>MYBPC3</i>	20	1	6
<i>MYH7</i>	1	5	6
<i>PTPN11</i>	1	0	0
<i>RAF1</i>	1	0	0
<i>MYL3</i>	0	2	0
<i>TNNT2</i>	0	1	1
<i>TNNI3</i>	0	1	0
<i>TPM1</i>	0	1	0
<i>CSRP3</i>	0	0	3
<i>ACTN2</i>	0	0	2
<i>DSP</i>	0	0	2
<i>CACNA1C</i>	0	0	1
<i>DES</i>	0	0	1
<i>DMD</i>	0	0	1
<i>DSG2</i>	0	0	1
<i>FHL2</i>	0	0	1
<i>LDB3</i>	0	0	1
<i>MYH6</i>	0	0	1
<i>MYL2</i>	0	0	1
<i>MYOZ2</i>	0	0	1
<i>NEXN</i>	0	0	1
<i>PKP2</i>	0	0	1
<i>SCN10A</i>	0	0	1
<i>SOS1</i>	0	0	1
<i>SCN2B</i>	0	0	1

Celkem 30 z těchto variant (v 8 různých genech) nalezených u 30 (23 %) pacientů bylo klasifikováno jako P/LP. Jejich distribuce je uvedena na Obr. 10. Nejvíce variant bylo identifikováno v genech *MYBPC3* a *MYH7*, přičemž *MYBPC3* hraje dominantní roli stran všech P/LP variant (62 %).



**Obr. 10.** Distribuce nalezených variant u pacientů po ASA. (Bonaventura *et al.* 2020)

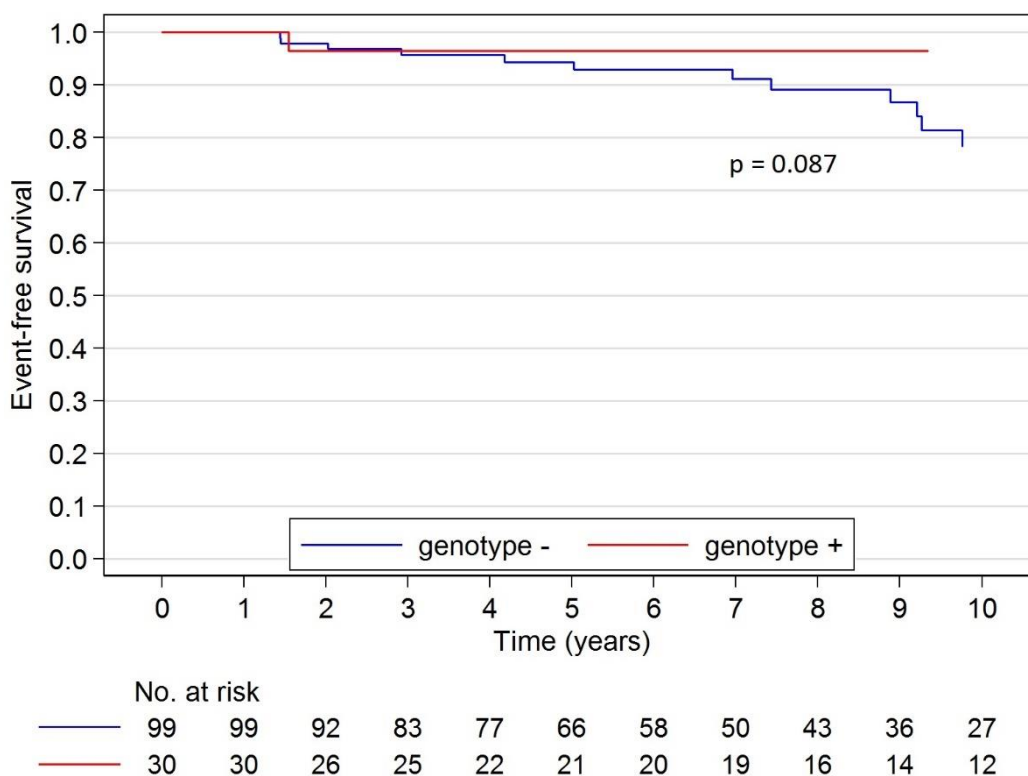
Žádný z pacientů v souboru nezemřel ani neměl cévní mozkovou příhodu během výkonu a do 30 dnů po ASA. Setrvalá komorová tachykardie nebo fibrilace komor s nutností urgentní defibrilace se vyskytla u 5 pacientů (4 %). Přechodný nebo perzistující kompletní atrioventrikulární (AV) blok byl dokumentován u 22 pacientů (17 %) a trvalý kardiostimulátor bylo nutné implantovat 9 pacientům (7 %) během hospitalizace. Komplikace v místě vpichu se vyskytla u 2 pacientů (2 %). V četnosti komplikací nebyl významný rozdíl mezi skupinami G+ a G- (Tab. 18)

**Tab. 18.** Komplikace ASA. (Bonaventura *et al.* 2020)

Typ nežádoucí události	G + (n=30)	G - (n=99)	p hodnota
Smrt (%)	0 (0)	0 (0)	NA
Cévní mozková příhoda (%)	0 (0)	0 (0)	NA
Fibrilace komor/sKT (%)	1 (3)	4 (4)	0.99
Kompletní AV blok (%)	2 (7)	20 (20)	0.10
Implantace trvalého kardiostimulátoru (%)	1 (3)	8 (8)	0.68
Kardiopulmonální resuscitace (%)	1 (3)	4 (4)	0.99
Komplikace v místě vpichu (%)	0	2 (2)	0.99

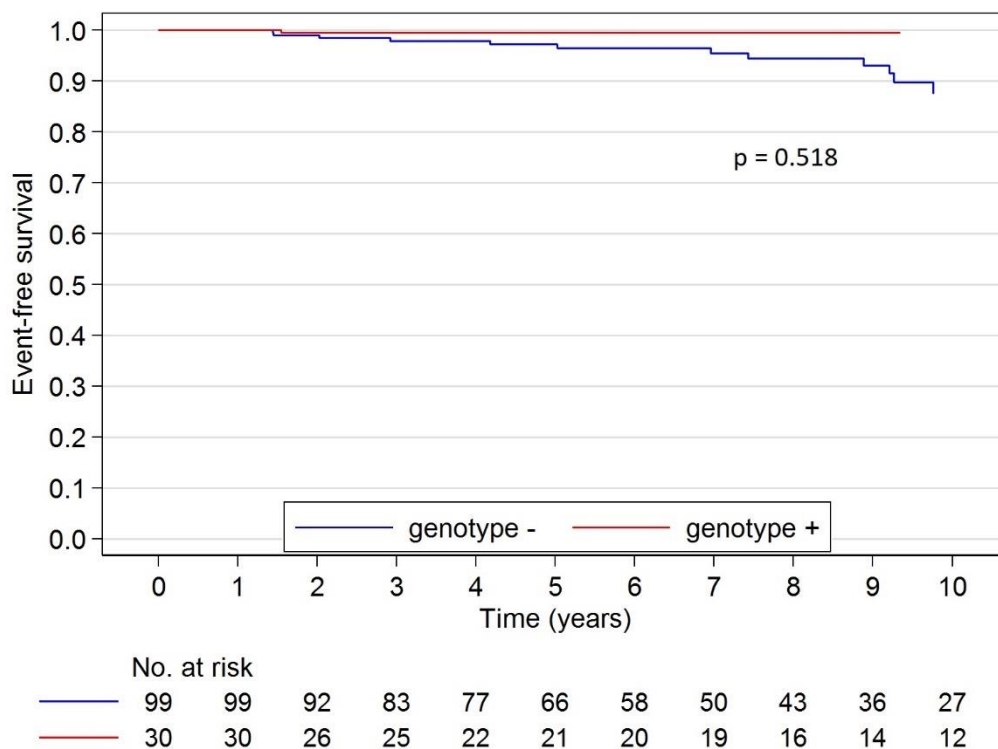
Vysvětlivky: sKT - setrvalá komorová tachykardie, AV – atrioventrikulární

Medián sledování (follow-up) všech pacientů po ASA byl 9.1 (6.3-12.9) let, průměr činil  $9.9 \pm 4.8$  let. Celkem 21 pacientů (16.3 %) zemřelo během 1211 pacientoroků sledování, což odpovídá frekvenci celkové mortality 1.7 úmrtí za 100 pacientoroků. V G+ skupině 2 pacienti (6.7 %) ze 30 pacientů zemřeli během sledování. V G- skupině zemřelo 19 pacientů (19.2 %) z 99 pacientů během sledování. Celková mortalita se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišila ( $p = 0.087$ ) (Obr. 11). Nezávislými prediktory celkové mortality byly identifikovány: tloušťka IVS před ASA (HR 1.12, 95% CI 1.00–1.26,  $p = 0.049$ ) a věk v době provedení ASA (HR 1.11, 95% CI 1.06–1.17,  $p < 0.001$ ). Celková mortalita adjustovaná na tloušťku IVS před ASA a věk v době ASA se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišila ( $p = 0.518$ ) (Obr. 12)



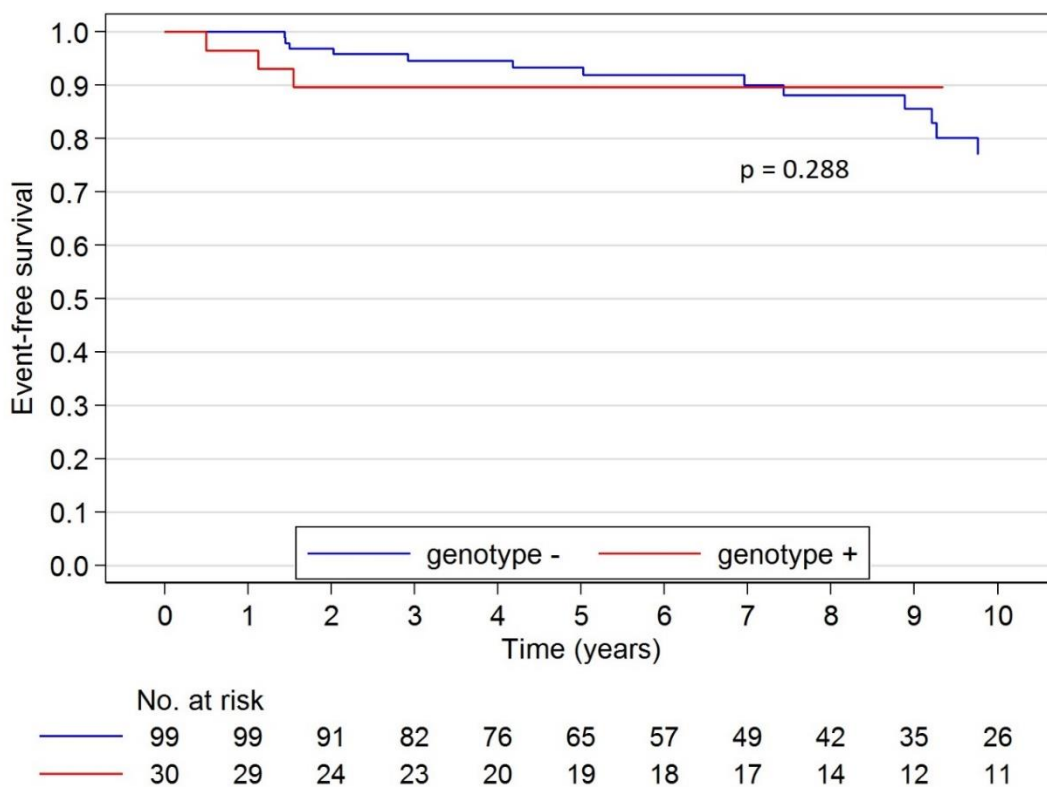
**Obr. 11.** Celková mortalita G+ a G- pacientů po ASA (Bonaventura et al. 2020)



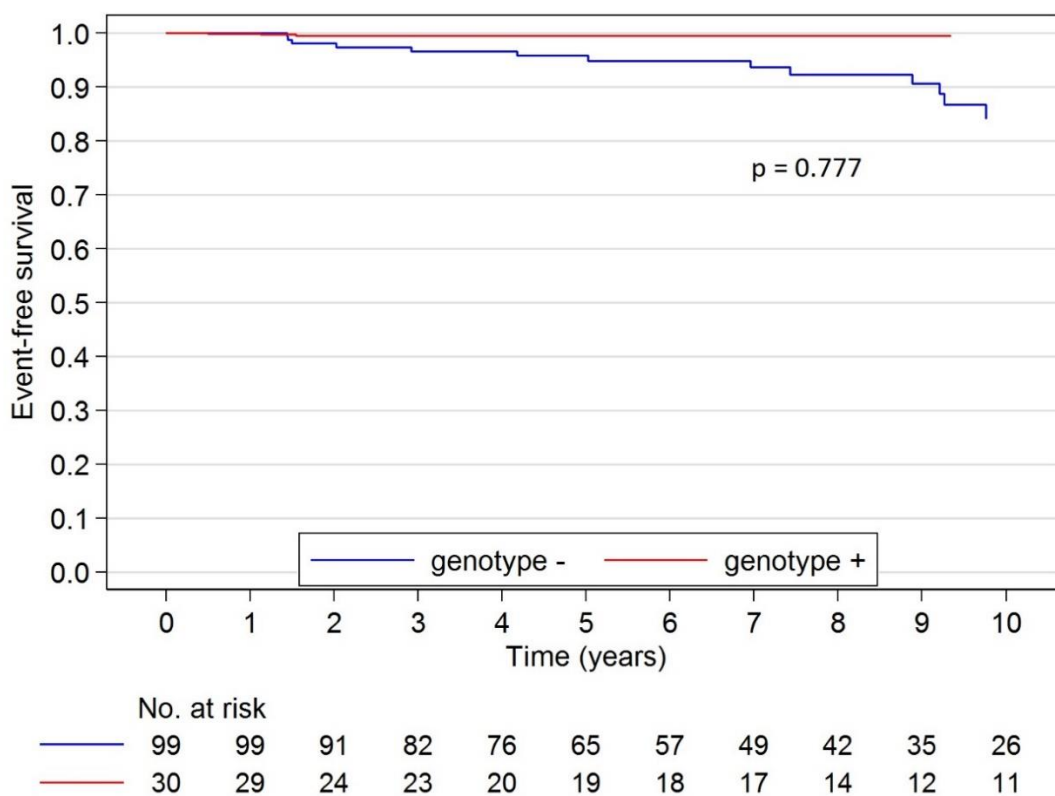


**Obr. 12.** Celková mortalita u G+ a G- pacientů po ASA, adjustovaná na tloušťku IVS před ASA a věk v době ASA. (Bonaventura *et al.* 2020)

Kombinovaný cílový ukazatel (celková mortalita a adekvátní výboj ICD) se vyskytl u celkem 24 pacientů (18.6 %) během 1211 pacientoroků sledování, což odpovídá frekvenci 2.0 úmrtí za 100 pacientoroků. Výskyt kombinovaného cílového ukazatele se mezi oběma skupinami statisticky významně nelišil ( $p = 0.288$ ) (Obr. 13). Nezávislými prediktory kombinovaného cílového ukazatele byly identifikovány: tloušťka IVS před ASA (HR 1.14, 95% CI 1.03–1.26,  $p = 0.011$ ) a věk v době provedení ASA (HR 1.07, 95% CI 1.03–1.12,  $p < 0.001$ ). Výskyt kombinovaného cílového ukazatele adjustovaný na tloušťku IVS před ASA a věk v době ASA se mezi skupinami G+ a G- statisticky významně nelišil ( $p = 0.777$ ) (Obr. 14).



**Obr. 13.** Kombinovaný cílový ukazatel (celková mortalita a adekvátní výboj ICD) u G+ a G – pacientů po ASA. (Bonaventura *et al.* 2020)



**Obr. 14.** Kombinovaný cílový ukazatel (celková mortalita a adekvátní výboj ICD) u G+ a G – pacientů po ASA, adjustovaný na tloušťku IVS a věk v době ASA. (Bonaventura *et al.* 2020)

## 5 Diskuse

### 5.1 Molekulárně genetický podklad HCM u pacientů v České republice

Genetický podklad HCM, jako relativně častého dědičného onemocnění, byl a je intenzivně zkoumán. V roce 1990 byla popsána první mutace v genu *MYH7*, která byla označena jako kauzální (Geisterfer-Lowrance *et al.*, 1990). V posledních dvou dekáдах bylo reportováno množství genů, které jsou nebo by mohly být asociovány s rozvojem HCM (Maron, Martin S Maron and Semsarian, 2012; Alfares *et al.*, 2015; Ingles *et al.*, 2015). Nejsilnější evidence o kauzalitě je u 8 základních sarkomerických genů: *MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC1*, *MYL2*, a *MYL3* (Gersh *et al.*, 2011; Ingles *et al.*, 2019). Středně silné důkazy o kauzalitě jsou u dalších 3 genů – *CSRP3*, *TNNC1* a *JPH2*. U ostatních genů je zatím evidence slabá nebo téměř žádná (Walsh, Buchan, *et al.*, 2017; Thomson *et al.*, 2018; Ingles *et al.*, 2019).

V naší studii bylo 336 pacientů s HCM molekulárně geneticky vyšetřeno pomocí masivního paralelního sekvenování (NGS) s využitím komplexního panelu, který obsahoval až 229 genů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními. Panel obsahoval sarkomerické i nesarkomerické geny, geny již potvrzené jako kauzální i geny pouze suspektní (Tab. 10). Studie tohoto rozsahu dosud na populaci českých pacientů nebyla provedena, z hlediska rozsahu vyšetřovaných genů (nikoli počtu pacientů) je studie i ve světě ojedinělá. Vzhledem k současné evidenci o kauzálních genech HCM navíc není příliš pravděpodobné, že bude v budoucnu takto široký panel využíván (Walsh, Buchan, *et al.*, 2017; Thomson *et al.*, 2018; Ingles *et al.*, 2019).

Dominantně mutovanými geny v české HCM populaci jsou sarkomerické geny *MYBPC3* a *MYH7*, což je v souladu s dosud známými daty z evropského i amerického kontinentu (Maron, Martin S. Maron and Semsarian, 2012; Alfares *et al.*, 2015; Ingles *et al.*, 2015). Nález dominance těchto genů není překvapivý ani v kontextu české populace, pokud jej porovnáme s proběhlým vyšetřováním z let 2005-2009 na Kardiologické klinice FNKV a 3.LF UK a v Kardiovaskulárním centru FN Motol. Celkem bylo tehdy molekulárně geneticky vyšetřeno 100 pacientů s HCM za použití klasické Sangerovy metody sekvenování u 4 genů - *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3* a *TNNT2* (Curila *et al.*, 2012). Omezený počet genů byl zvolen vzhledem k jejich předpokládané vysoké prevalenci na základě publikovaných dat z jiných zemí a kvůli optimalizaci finančních nákladů.

Prevalence mutací v genech *TNNI3* a *TNNT2* byla při vyšetřování v letech 2005-2009 nízká (Curila *et al.*, 2009). Nyní jsme v našem více než 3x větším souboru pacientů identifikovali jedinou LP mutaci v genu *TNNI3*, v genu *TNNT2* pak 4 P/LP varianty a 2 VUS (Tab. 9). Nízká prevalence mutací v genu *TNNI3* je v porovnání s dosud publikovanými pracemi (podíl 4-5% mezi P/LP variantami) neobvyklá (Richard *et al.*, 2003; Alfares *et al.*, 2015). To může být způsobeno stále ještě relativně malým vzorkem pacientů, resp. celkovým počtem pouze 72 P/LP variant, podobně jako v recentní práci francouzských autorů, kde 200 pacientů vyšetřili podrobně pomocí WES a nenalezli ani jednu mutaci v *TNNI3* (Nguyen *et al.*, 2019).

Kromě výše uvedených frekventně zastoupených genů jsme našli několik vzácnějších variant v nesarkomerických genech. Podařilo se nám tak podrobně zmapovat genetický podklad HCM pacientů v ČR. Někteří pacienti by bez provedení molekulárně genetického vyšetření nebyli správně diagnostikováni. Příkladem jsou nálezy v genech *RAF1* a *PTPN11*, které pomohly u pacientů potvrdit diagnózu syndromu Noonanové a LEOPARD syndromu. Nález patogenní mutace v *GLA* genu umožnil správnou diagnózu pacienta s Fabryho chorobou, která v době vyšetření nebyla klinicky zjevná. V tomto případě je nález zcela zásadní v kontextu dostupné enzymatické substituční terapie. Ukazuje se, že tato léčba je efektivnější, pokud je podána v časných fázích onemocnění, tj. před rozvinutím výrazné hypertrofie a myokardiální fibrózy (Yogasundaram *et al.*, 2017).

Identifikovali jsme velké množství VUS, jejichž klinický význam v tuto chvíli spočívá zejména v archivaci v klinických databázích (např. ClinVar) a kaskádovitým vyšetřování příbuzných ke zjištění jejich segregace s fenotypem (viz výsledky v kapitole 4.4). Tato data jsou následně podkladem pro jejich klasifikaci patogenicity (Richards *et al.*, 2015). Získané výsledky je nutné také periodicky znovu vyhodnocovat a nalezené VUS ev. reklasifikovat do vyšší či nižší třídy patogenicity. Příkladem je např. relativně nový kandidátní gen *NEBL* pro protein Z-disků sarkomer nebulin (Perrot *et al.*, 2016), jehož mutace byly nalezeny u 2 pacientů z našeho souboru (Tab. 9).

## 5.2 Klinické a morfologické charakteristiky související s pozitivním genotypem

G+ pacienti jsou významně (v průměru o 11 let) mladší a mají méně často arteriální hypertenzi. Je u nich též statisticky významně častější rodinná anamnéza HCM. U G+ pacientů při echokardiografickém vyšetření častěji nalézáme reversní typ IVS než u G-

pacientů. S výskytem sigmoidního tvaru IVS je to přesně naopak. Všechny tyto faktory zohledňuje predikční systém Mayo Score (Bos *et al.*, 2014). V systémech Mayo Score ani Toronto Score (Gruner *et al.*, 2013) však není zahrnuta přítomnost obstrukce. V našem souboru pacientů jsme identifikovali významně častější výskyt obstrukce LVOT u G+ pacientů (71 % vs. 53 %). Pozoruhodné je, že přes častější výskyt u G+ pacientů se její závažnost (tj. tlakový gradient v mmHg) mezi oběma skupinami nelišila (Tab. 14). Tento nálezn je v rozporu z prací autorů Toronto Score, kde byl naopak výskyt obstrukce LVOT častější u G- pacientů (Gruner *et al.*, 2013). Přítomnost obstrukce byla v jejich práci také zahrnuta do prvotní multivariantní analýzy 16 proměnných, nebyla však následně prokázána jako statisticky významný nezávislý prediktor záchytu P/LP mutací. Nicméně v kanadské práci byla celková prevalence obstrukce v souboru HCM pacientů poměrně nízká (44 %) a vyvolává tak otázku (ač dle metodiky má kohorta zahrnovat pacienty s klidovou i provokovanou obstrukcí) o technice jejího měření (Gruner *et al.*, 2013). Prevalence v originální kohortě Mayo Score je jen o málo vyšší (47 %) a většina z nich je léčena chirurgickou myektomií (Bos *et al.*, 2014), na rozdíl od našich pacientů, kteří jsou převážně léčeni ASA. Jedním z možných vysvětlení relativně vyššího záchytu obstrukce v našem souboru by mohl být fakt, že na našem pracovišti často k provokaci obstrukce používáme sublinguální podání isosorbid-dinitrátu (ISDN) v kombinaci s Valsalvovým manévrem, což zvyšuje senzitivitu vyšetření (Zemanek *et al.*, 2015). Údaje o používání ISDN při diagnostice ve zmíněných kohortách nebyly publikovány.

Apikální forma HCM se vyskytla pouze u 7 pacientů z celého souboru. Tento nálezn je v souladu se známým faktem, že prevalence apikální formy je v západních zemích okolo 3 % všech HCM pacientů (Maron *et al.*, 1982; Eriksson *et al.*, 2002; Kitaoka *et al.*, 2003). Prevalence v Japonsku je však cca 5x častější (Kitaoka *et al.*, 2003) a byla zde též poprvé před více než 40 lety popsána (Yamaguchi *et al.*, 1979).

V našem souboru se významně nelišily skupiny G+ a G- v zastoupení pohlaví (Tab. 14). Tento nálezn je v rozporu z prací autorů Toronto Score, kde bylo ženské pohlaví stanoveno jako nezávislý prediktor záchytu P/LP mutace a je součástí finálního skórovacího systému (Gruner *et al.*, 2013).

V porovnání s reportovanou prevalencí (okolo 30 %) ve většině publikovaných studií (Bos *et al.*, 2014; Alfares *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2016; Cirino *et al.*, 2017) jsou v našem souboru relativně málo zastoupeni pacienti s pozitivní rodinnou anamnézou HCM– pouze v 11 %.

Toto je pravděpodobně způsobeno naším studijním záměrem (selekční bias) molekulárně geneticky vyšetřovat nepříbuzné pacienty a pokrýt tak co nejširší spektrum mutací.

Dále je pozoruhodný relativně vysoký průměrný věk diagnostikovaných HCM pacientů. Naši HCM pacienti jsou v době diagnózy průměrně o cca 8-9 let starší, než v podobných publikovaných zahraničních studiích (Richard *et al.*, 2003; Bos *et al.*, 2014; Alfares *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2016). Vyšší věk může souviset právě s nízkou prevalencí rodinné anamnézy HCM a dlouhým asymptomatickým obdobím (Morita *et al.*, 2008; Maron, Yeates and Semsarian, 2011; Elliott *et al.*, 2014). U pacientů s mírnějším fenotypem HCM, typickým pozdním nástupem onemocnění, sigmoidním tvarem IVS a současnou arteriální hypertenzí často pravděpodobně není hypertrofie LK (ač splňuje diagnostická kritéria HCM) primárně způsobena mutací sarkomerických proteinů. Může se tak spíše jednat o důsledek vysokého věku, komorbidit (např. diabetes mellitus, renální insuficience), možných ireverzibilních změn při anamnéze letité arteriální hypertenze (ač nyní dobře léčené, podmínka dg. HCM) a různých genetických modifikátorů (viz Kapitola 1.6). Jistě významnou část starších pacientů budou tvořit pacienti s tzv. senilní (wild-type) transtyrelinovou amyloidózou, u které se na základě recentních studií předpokládá vysoká prevalence a poddiagnostikování choroby v běžné populaci (Rigopoulos *et al.*, 2019). Nutno zde konstatovat, že srdeční amyloidóza nebyla rutinně vylučována u všech našich HCM pacientů. V současné době je možnost neinvazivní diagnostiky dostupným scintigrafickým vyšetřením pomocí 1,2-dikarboxypropandifosfonové kyseliny (DPD) značené techneciem 99m (Rapezzi *et al.*, 2013).

### 5.3 Predikce výsledku molekulárně genetického vyšetření

Výtěžnost molekulárně genetického vyšetření je variabilní a dosahuje 20 až 60 % dle vyšetřované populace (Van Driest *et al.*, 2005; Charron *et al.*, 2010; Bos *et al.*, 2014). U první české studie z let 2005-2009 činila výtěžnost při 4 vyšetřovaných genech (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNT2*) přesně 40 % (Curila *et al.*, 2012). V originální kohortě Mayo Score pacientů bylo vyšetřováno 9 základních sarkomerických genů (*ACTC1*, *MYBPC3*, *MYH7*, *MYL2*, *MYL3*, *TNNC1*, *TNNI3*, *TNNT2*, *TPM1*) a výtěžnost byla 34 % (Bos *et al.*, 2014).

Pravděpodobnost zachytu patogenní mutace je vyšší u mladších pacientů a pacientů s pozitivní rodinnou anamnézou, kde může dosahovat 50-60% (Elliott *et al.*, 2014). V našem souboru máme pacienty spíše vyššího věku a bez rodinné anamnézy HCM, jak již

diskutujeme v kapitole 5.2. U ostatních pacientů se pohybuje okolo 20-40% (Richard *et al.*, 2003). Kritéria pro definování patogenicity nalezených variant se v průběhu let zásadně zpřísnila. V roce 2015 byla publikována doporučení ACMG pro klasifikaci genetických variant, která jsou velmi komplexní (Richards *et al.* 2015). Se zavedením přísnějších klasifikačních kritérií ACMG je v publikovaných studiích záchyt ještě nižší (Richards *et al.*, 2015; Amendola *et al.*, 2016).

Z výše uvedených skutečností plyne, že předpokládaný záchyt P/LP mutací v našem souboru bude někde mezi 20 a 30 %. Metodika i rozsah vyšetřovaných genů se ve studiích liší. V naší studii jsme stanovili hypotézu, že zařazení velkého počtu genů do diagnostického panelu by mohlo vést k vyšší výtěžnosti molekulárně genetického vyšetření. Proto jsme postupně během studie panely expandovali a většina (82 %) pacientů z našeho souboru tak byla vyšetřena panelem obsahujícím 229 genů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními. Je samozřejmé, že náš panel obsahoval i všechny výše uvedené základní sarkomerické geny (Tab. 10)

Naše hypotéza však nebyla potvrzena. Větší počet genů nevedl k významně vyšší výtěžnosti molekulárně genetického vyšetření; ta v našem souboru činila pouze 21 %. P/LP varianty byly nalezeny pouze v 10 genech, v ostatních jsme nalézali VUS (Tab. 9). Tuto nízkou výtěžnost si vysvětlujeme striktním dodržováním klasifikačních kritérií nalezených variant podle ACMG (Richards *et al.*, 2015). V minulé dekádě byla např. kritéria patogenicity založena pouze na absenci nalezených variant u 50-100 zdravých kontrol (Van Driest *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2009). To se jeví v současné době jako naprosto nedostačující a tato publikovaná data bude nutno revidovat. V originální kohortě Mayo Score pacientů k definování varianty jako patogenní stačilo, aby buď a) nebyla přítomna u kontrolní skupiny 8400 veřejně dostupných genomů/exomů zdravých jedinců, nebo b) mohla být přítomna ve frekvenci  $\leq 0.01\%$  zdravých kontrol a zároveň ve významně vyšší frekvenci u pacientů s HCM (Bos *et al.*, 2014). O dva roky později autoři originální Mayo Score práce publikovali validační studii svého skórovacího systému na nové kohortě pacientů. V této validační studii byli pacienti označeni jako G+, pokud u nich byla nalezena P/LP varianta nebo VUS (Murphy *et al.*, 2016). Všechny nalezené varianty byly ve validační studii znovu analyzovány následujícím způsobem: evaluace MAF (frekvence minoritní alely) v populační databázi Exome Aggregation Consortium (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>), reference v klinické databázi ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) a aplikace několika in silico predikčních nástrojů (PolyPhen, SIFT, Mutation Assessor, Condel a Grantham score). Varianty, které měly MAF >

0.01% byly reklasifikovány jako VUS-pravděpodobně benigní. Výsledkem byl výrazný pokles diagnostické výtěžnosti u pacientů s nízkým Mayo Score (-1, 0 a 1) na 16 %, 20 % a 26 % (Murphy *et al.*, 2016). Od skóre  $\geq 2$  činila výtěžnost 61 – 94 % a i po této reklasifikaci variant zůstávala vysoká (Murphy *et al.*, 2016). V našem souboru (Tab. 15) pozorujeme u pacientů s nízkým Mayo Score (-1, 0 a 1) podobně nízkou diagnostickou výtěžnost: 6 %, 12 % a 21 %.

V naší studii byly všechny nalezené varianty striktně klasifikovány podle ACMG guidelines do 5 definovaných tříd dle patogenicity (Richards *et al.*, 2015). V základní analýze jsme pouze nález P/LP varianty považovali za G+. Nejvýraznějším rozdílem v hodnocení variant proti originální i validační kohortě Mayo Score byla skutečnost, že všechny varianty s MAF vyšší než pro HCM kalkulovanou frekvenci vzácných variant, tj.  $4 \times 10^{-5}$  (Whiffin *et al.* 2017) byly z další analýzy odstraněny ještě před finální fází bioinformatického zpracování sekvenačních dat (Kapitola 3.2). Definovaná hranice MAF vychází z předpokladu, že autosomálně dominantní patogenní alela nemůže být v populaci zastoupena ve vyšší frekvenci než samotné onemocnění, které má způsobovat. Jako model byla použita ta patogenní mutace, která je v populaci HCM nejvíce zastoupena: missense varianta v genu *MYBPC3* c.1504C>T (p.Arg502Trp), nalezena u 104 nemocných z rozsáhlého reprezentativního vzorku 6179 HCM pacientů (podíl na HCM populaci je 1.7%; 95% CI 1.4–2.0%) (Alfares *et al.*, 2015; Walsh, Thomson, *et al.*, 2017; Whiffin *et al.*, 2017). Kalkulace horní hranice frekvence výskytu ev. nové patogenní alely (=MAF) je tedy:

$$1/500 \text{ (prevalence HCM)} \times 1/2 \text{ (párové chromozomy)} \times 0.02 \text{ (frekvence nejčastější mutace MYBPC3 c.1504C>T v populaci HCM)} \times 1/0.5 \text{ (penetrance)} = 4.0 \times 10^{-5}$$

(Whiffin *et al.*, 2017)

Výše uvedená aplikace vyřazení variant s určitou MAF a aplikace ACMG guidelines vysvětlují nízkou výtěžnost molekulárně genetického vyšetření v naší studii oproti Mayo kohortám (45 % validační kohorta se zahrnutím VUS po reklasifikaci a 34 % původní kohorta). Záměrně jsme proto provedli paralelní analýzu, kdy za G+ budou považovány nálezy P/LP variant včetně VUS (Tab. 15, Obr. 8). Diagnostická výtěžnost se následně přesně zdvojnásobila na 42 %, tedy zcela srovnatelné s Mayo kohortami a logické vzhledem k podobnější metodice hodnocení výtěžnosti. Cenným nálezem je fakt, že i při zahrnutí VUS hodnoty Mayo Score konsistentně predikují výtěžnost – čím vyšší hodnota, tím vyšší výtěžnost (Tab. 15). Oba přístupy (zahrnutí i nezahrnutí VUS do G+) tedy přinášejí důležitou informaci do klinické praxe; Mayo Score 2 a vyšší by mělo vést k indikaci molekulárně



genetického vyšetření. U pacientů s nízkým Mayo Score (-1, 0 a 1) je indikace spíše výzkumná (ke sběru dat a jejich reportování) než klinická. Dále je nutno poznamenat, že náš experimentální přístup stran širě vyšetřovaného panelu genů pravděpodobně není výhodné přenést do běžné klinické praxe kvůli nepříznivému poměru cena vs. přidaná diagnostická informace.

Naše studie má několik limitací. Jedná se o studii z jednoho centra. Nemůžeme si tedy být jisti, zda lze nalezené výsledky plně generalizovat na populaci HCM pacientů v ČR, kteří nejsou referováni do terciárního centra. Během naší studie byly použity celkem 3 vyšetřovací panely genů (viz kapitola 3.2). Nepovažujeme to však za limitaci zásadní, jelikož 82 % všech pacientů bylo vyšetřeno nejnovějším a nejširším panelem v průběhu let 2015-2017 (z krevních vzorků z předešlých let byla izolována DNA a uchována v bance). Naše studie zahrnovala pouze dospělé pacienty, výsledky tedy nelze aplikovat na populaci dětských pacientů s odlišným fenotypem i rizikovým profilem.

#### 5.4 Kaskádovité vyšetřování příbuzných

V předchozí kapitole (5.3) jsme diskutovali fakt, že zařazení velkého počtu genů do diagnostického panelu nevedlo k vyšší výtěžnosti molekulárně genetického vyšetření. To má zásadní vliv i na indikace genetického screeningu příbuzných pacientů s HCM. V tomto případě jsou (vzhledem k nutnosti kontinuálního sběru dat a rozšiřování znalostí o etiologii HCM) cenné i všechny nalezené VUS a možnost jejich segreganční analýzy v rodinách. Pro interpretaci výsledků molekulárně genetického vyšetření je právě možnost evaluace více rodinných příslušníků s HCM zcela zásadní. Hledá se varianta, kterou postižení příbuzní sdílejí, nebo naopak nepostižení nemají. Čím více rodinných příslušníků je vyšetřeno, tím se zvyšuje validita molekulárně genetických výstupů a je možné potom nabídnout prediktivní testování příčinné DNA varianty u dětí či pro primární prevenci onemocnění využitím metod preimplantačního testování embryí (Bonaventura et al. 2020). V současné době tyto genetické konzultace probíhají u IV. a V. generace prezentované rodiny (Obr. 9) na Ústavu biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol.

V běžné klinické praxi indikuje molekulárně genetické vyšetření klinický genetik a je smysluplné u pacientů s vysokým stupněm podezření na genetickou příčinu, zejména pokud mají žijící příbuzné, kteří mají zájem se nechat vyšetřit. Námí prezentovaný kaskádovitý rodinný screening (Kap. 4.4) je toho ilustrativním příkladem.

Screeningové vyšetření probandky mělo tedy za následek následující preventivní opatření:

- Identifikace rizikových faktorů HCM u probandky a implantace ICD v primární prevenci SCD
- Identifikace jednoznačné molekulárně genetické příčiny HCM v této rodině a tou je mutace MYBPC3:c.3697C>T p.(Gln1233\*), která vede k terminaci peptidového řetězce proteinu
- Korekce dalších molekulárně genetických nálezů z laboratoře a prevence iatrogenizace při nálezu VUS během vyšetřování příbuzných
- Identifikace asymptomatických nosičů v rodině (IV. a V. generace) a jejich pravidelné klinické sledování včetně stratifikace rizika SCD stejným postupem jako u probandky
- U nejmladších pacientů V. generace (Obr. 9 vpravo dole) jejich časné předání pediatrovi - kardiologovi s vyšetřením nejpozději v mladším školním věku dle aktuálních doporučení (Elliott *et al.*, 2014). V případě záchytu patogenní mutace budeme jistě věkovou hranici počátku dispenzarizace modifikovat.

## 5.5 Vliv genotypu na výsledky alkoholové septální ablace

Naše studie ukazuje, že ASA je stejně efektivní léčbou obstrukce LVOT u G+ HCM pacientů jako u G- HCM pacientů. Toto zjištění je zvláště důležité, když si uvědomíme fakt, že G+ pacienti mají obvykle závažnější fenotyp HCM a horší prognózu v porovnání s G- pacienty (Ho *et al.*, 2018; Lopes *et al.*, 2019).

Reportovaná data o G+ pacientech ukazují, že se obvykle s dg. HCM prezentují v nižším věku, mají výraznější hypertrofii IVS a menší enddiastolický rozměr LK (Binder *et al.*, 2006; Bos *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2015). Bylo též reportováno zvýšené riziko kardiovaskulární mortality, cévní mozkové příhody a srdečního selhání třídy NYHA III-IV oproti G- pacientům (Olivotto *et al.*, 2008). Data z portugalského registru naznačují vyšší riziko SCD, pravděpodobně kvůli asociaci s konvenčními rizikovými faktory SCD dle doporučení ESC i amerických společností (ACC, American College of Cardiology; AHA, American Heart Association) (Lopes *et al.*, 2019). Základní charakteristiky našeho souboru jsou v souladu s reportovanými daty. G+ pacienti jsou diagnostikováni v nižším věku, mají výraznější hypertrofii IVS a menší enddiastolický rozměr LK (Tab. 16).

Do naší studie byli zařazeni vysoce symptomatictí pacienti s obstrukcí LVOT. Důležitým se jeví nález téměř identické tíže obstrukce LVOT mezi oběma skupinami, podobně jako je tomu v celém našem neselektovaném souboru (Tab. 14). Symptomatologie (angina třída CCS, dušnost třída NYHA, synkopy) se mezi G+ a G- pacienty taktéž významně neliší. U obou skupiny se tyto symptomy po ASA konzistentně zlepšily. Zlepšení symptomatologie po provedení ASA již bylo publikováno v několika studiích (Olivotto *et al.*, 2008; Veselka, Jensen, Liebrechts, Januska, Krejci, Bartel, Dabrowski, Hansen, Almaas, *et al.*, 2016; Veselka, Tomašov, *et al.*, 2016; Veselka, Polaková and Bonaventura, 2019). Vliv molekulárně genetické etiologie na osud pacientů po ASA nebyl dosud zkoumán a naše nynější výsledky jsou tak unikátní. Naše nálezy také doplňují reportovaná data o srovnatelných výsledcích po ASA mezi různými podskupinami pacientů z registru Euro-ASA (Veselka, Jensen, Liebrechts, Januska, Krejci, Bartel, Dabrowski, Hansen, Almaas, *et al.*, 2016), kde genetické vyšetřování též nebylo zohledňováno. Jelikož je residuální obstrukce LVOT spojena s horší prognózou (Veselka, Tomašov, *et al.*, 2016), je nyní námi zjištěná informace o stejné účinnosti ASA u G+ i G- pro volbu léčby a osud pacientů zásadní.

Dlouhodobé přežití se v našem souboru HCM pacientů po ASA nelišilo mezi G+ a G- pacienty. Stejně tak se statisticky významně nelišil výskyt kombinovaného cílového ukazatele (celková mortalita a adekvátní výboj ICD). I přes relativně dlouhou dobu sledování (medián více než 9 let), byla incidence mortalitních endpointů relativně nízká. Naše studie tedy zároveň zdůrazňuje velmi dobrou prognózu HCM pacientů po ASA, bez ohledu na genetickou příčinu. Predikce prognózy pacientů s HCM je složitá, zejména u takto výrazně heterogenního souboru. Multivariantní analýzou (popis v kapitole 3.3.) jsme identifikovali nezávislé prediktory mortality – věk v době provedení ASA a tloušťku IVS před provedením ASA. I po adjustaci na tyto nezávislé prediktory se přežití mezi G+ a G- statisticky významně nelišilo (Obr. 12 a 13). Nicméně relativně nízký počet endpointů multivariantní analýzu poněkud kompromituje.

Dalším významným zjištěním v naší práci byla bezpečnost ASA procedury, která nebyla nijak ovlivněna genetickým pozadím (Tab. 18). I přes výraznější hypertrofii IVS byl výskyt maligních arytmií i kardiopulmonální resuscitace bez významného rozdílu mezi G+ i G- pacienty. Pacienti G- měli tendenci k vyššímu výskytu kompletního (a převážně tranzientního) AV bloku po ASA, nicméně nejedná se o statisticky významný rozdíl. Počet implantovaných kardiostimulátorů po ASA se mezi skupinami nelišil.

V naší studii prezentujeme dosud největší kohortu HCM pacientů po ASA komplexně vyšetřenou masivním paralelním sekvenováním (NGS). Pouze 23 % nalezených genetických variant bylo klasifikováno jako P/LP, v souladu s nízkou výtěžností v celém našem souboru i publikovanými daty (Bonaventura *et al.*, 2019). Expandovaný vyšetřovací panel genů nám nepřinesl vyšší výtěžnost ani u pacientů s ASA, jak již dokumentováno na neselektované populaci HCM pacientů převážně bez obstrukce, tedy neléčených ASA (Alfares *et al.*, 2015; Walsh, Thomson, *et al.*, 2017; Ingles *et al.*, 2019) i v našem neselektovaném souboru (kapitola 5.3.). Ve studii HCM po ASA také byly P/LP mutace (až na dvě výjimky – *PTPN11* a *RAF1*) nalézány pouze v sarkomerických genech. Zde navážeme na diskuzi z kapitoly 5.2 o heterogenitě našeho souboru a známý fakt, že i pacienti s morfologií IVS typu sigmoideum mají často významnou obstrukci LVOT (Bos *et al.*, 2014). Nízká výtěžnost molekulárně genetického vyšetření nám naznačuje, že část pacientů léčená ASA pravděpodobně netrpí dědičnou (monogenně podmíněnou) formou HCM, nebo minimálně nerespektuje mendelovskou dědičnost (Ko *et al.*, 2018). Jejich fenotyp splňuje kritéria HCM (Gersh *et al.*, 2011; Elliott *et al.*, 2014) a má některé typické znaky včetně obstrukce LVOT. Výsledky naší práce naznačují, že jak dědičné i (pravděpodobně) nedědičné formy HCM s obstrukcí mohou být efektivně léčeni ASA a klinické rozhodnutí o indikaci této procedury by nemělo být ovlivněno genetickým pozadím.

I tato naše studie s ASA pacienty má své limitace. Jedná se o retrospektivní analýzu prospektivně (v průběhu let 1998-2017) sbíraných dat. Ačkoli se jedná o unikátní kohortu ASA pacientů, velikost vzorku (síla studie) není dostatečná ke zhodnocení mortalitních dat. Dále není jisté, zda lze nalezené výsledky plně generalizovat na celou populaci HCM pacientů s obstrukcí, kteří nejsou léčeni v terciárních centrech s dostatečnou zkušeností s ASA. Zkušenosti centra s tímto intervenčním výkonem jsou naprosto klíčové k dosažení dobrých výsledků a nízkého procenta komplikací (Veselka *et al.*, 2018). Tímto dále deklarujeme další selekční bias – ve studii byli pacienti pečlivě vybráni pro ASA po zhodnocení morfologických charakteristik jejich IVS i mitrálního aparátu. V neposlední řadě, stejně jako v celém našem souboru pacientů, se jednalo pouze o dospělé pacienty podstupující ASA a nelze tak výsledky aplikovat na populaci dětských pacientů.

## 6 Závěr

U 336 pacientů s HCM jsme provedli molekulárně genetickou analýzu masivním paralelním sekvenováním (NGS) za použití panelů obsahujících až 229 genů asociovaných s kardiovaskulárními onemocněními. Počet vyšetřených genů v naší studii je zcela unikátní a sloužil ke zmapování genetického podkladu HCM u pacientů v ČR. Většina P/LP mutací byla nalezena v genech *MYBPC3* a *MYH7*.

G+ pacienti jsou významně mladší, mají méně často arteriální hypertenzi a je u nich častější rodinná anamnéza HCM. U G+ pacientů při echokardiografickém vyšetření častěji nalézáme reversní typ IVS než u G-. U G- pacientů je častější nález sigmoidního IVS. Tyto parametry jsou součástí predikčních systémů k odhadu výtěžnosti.

Vysoký počet vyšetřovaných genů nevedl k významně vyšší diagnostické výtěžnosti molekulárně genetického vyšetření (G+); ta v našem soboru činila pouze 21 %. Tuto nízkou výtěžnost si vysvětlujeme striktním dodržováním klasifikačních kritérií patogenicity nalezených variant podle ACMG guidelines. Pokud bychom za G+ považovali i nález VUS, jak bylo provedeno v minulosti na kohortách Mayo Score pacientů, tak by se výtěžnost zdvojnásobila na 42 %. Při použití obou metod systém Mayo Score konzistentně predikuje diagnostickou výtěžnost a jeho použití se jeví v klinické praxi, kde je patrna limitace finančními prostředky, jako racionální. Vzhledem k časové i finanční náročnosti molekulárně genetického vyšetření tak lze pečlivou selekcí pacientů zamezit velkému množství negativních nebo nejasných výsledků a nadužívání metody NGS v běžné klinické praxi.

Genetický screening má v péči o pacienty s HCM a jejich příbuzné významné postavení. Význam byl demonstrován na kazuistice rodiny, kde se podařilo dokonale kompletizovat data, stanovit typ dědičnosti i molekulárně genetickou příčinu HCM. Screeningové vyšetření probandky mělo za následek několik preventivních opatření, mezi nejdůležitější patří prevence SCD.

Ačkoli mají G+ pacienti těžší fenotyp HCM, ASA je u nich stejně efektivní metodou léčby obstrukce LVOT jako u G- pacientů. Dlouhodobé přežití pacientů s obstrukční HCM po ASA je u G+ i G- podobné. Výsledky naší práce naznačují, že jak dědičné, tak i (pravděpodobně) nedědičné formy HCM s obstrukcí mohou být efektivně léčeni ASA.

## 7 Seznam použité literatury

1. *1000Genomes Project*. Dostupné z <http://www.internationalgenome.org/>.
2. Alfares, A. A. *et al.* (2015) ‘Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: Expanded panels offer limited additional sensitivity’, *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 17(11), pp. 880–888. doi: 10.1038/gim.2014.205.
3. Amendola, L. M. *et al.* (2016) ‘Performance of ACMG-AMP Variant-Interpretation Guidelines among Nine Laboratories in the Clinical Sequencing Exploratory Research Consortium’, *American Journal of Human Genetics*, 98(6), pp. 1067–1076. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.03.024.
4. Andersen, P. S. *et al.* (2009) ‘Diagnostic yield, interpretation, and clinical utility of mutation screening of sarcomere encoding genes in Danish hypertrophic cardiomyopathy patients and relatives’, *Human Mutation*, 30(3), pp. 363–370. doi: 10.1002/humu.20862.
5. Van der Auwera, G. A. *et al.* (2013) ‘From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline’, *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 43(SUPL.43), pp. 11.10.1-33. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43.
6. Biagini, E. *et al.* (2005) ‘Dilated-hypokinetic evolution of hypertrophic cardiomyopathy: Prevalence, incidence, risk factors, and prognostic implications in pediatric and adult patients’, *Journal of the American College of Cardiology*, 46(8), pp. 1543–1550. doi: 10.1016/j.jacc.2005.04.062.
7. Binder, J. *et al.* (2006) ‘Echocardiography-Guided Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy: Septal Morphological Features Predict the Presence of Myofilament Mutations’, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, 81(4), pp. 459–467. doi: 10.4065/81.4.459.
8. Blankenburg, R. *et al.* (2014) ‘ $\beta$ -Myosin Heavy Chain Variant Val606Met Causes Very Mild Hypertrophic Cardiomyopathy in Mice, but Exacerbates HCM Phenotypes in Mice Carrying Other HCM Mutations’, *Circulation Research*. NIH Public Access, 115(2), pp. 227–237. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303178.
9. Bonaventura, J. *et al.* (2019) ‘The utility of the Mayo Score for predicting the yield of genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy’, *Archives of Medical*

- Science*. Termedia, 15(3), pp. 641–649. doi: 10.5114/aoms.2018.78767.
10. Bonaventura, J. *et al.* (2020) ‘Patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy after alcohol septal ablation have favorable long-term outcome irrespective of their genetic background’, *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 0(0). doi: 10.21037/cdt.2020.01.12.
  11. Bonaventura, J. a Veselka, J. (2019) ‘Genetic testing in patients with hypertrophic cardiomyopathy’, *Vnitřní Lekarství*, 65(10), pp. 652–658.
  12. Bonaventura, J *et al.* (2020) Komplexní přístup k pacientům s hypertrofickou kardiomyopatií a indikace ke genetickému vyšetření. *Cor et Vasa* 2020, 62(3):272-278, DOI: 10.33678/cor.2020.023
  13. Bortot, B. *et al.* (2011) ‘High-throughput Genotyping Robot-assisted Method for Mutation Detection in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Diagnostic Molecular Pathology*, 20(3), pp. 175–179. doi: 10.1097/PDM.0b013e31820b34fb.
  14. Bos, J. M. *et al.* (2014) ‘Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy’, *Mayo Clinic Proceedings*, 89(6), pp. 727–737. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.01.025.
  15. Cardoso, B. *et al.* (2017) ‘Clinical and genetic diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy: Results in pediatric cardiology’, *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 36(3), pp. 155–165. doi: 10.1016/j.repc.2016.09.009.
  16. Charron, P. *et al.* (1997) ‘Penetrance of familial hypertrophic cardiomyopathy.’, *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)*, 8(2), pp. 107–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9219008> (Accessed: 24 March 2019).
  17. Charron, P. *et al.* (2010) ‘Genetic counselling and testing in cardiomyopathies: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases’, *European Heart Journal*, 31(22), pp. 2715–2726. doi: 10.1093/eurheartj/ehq271.
  18. Cirino, A. L. *et al.* (2017) ‘A Comparison of Whole Genome Sequencing to Multigene Panel Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients.’, *Circulation Cardiovascular genetics*. American Heart Association, Inc., 10(5), p. e001768. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.117.001768.
  19. *ClinVar* (no date). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>.
  20. Colan, S. D. *et al.* (2007) ‘Epidemiology and cause-specific outcome of hypertrophic cardiomyopathy in children: Findings from the Pediatric Cardiomyopathy Registry’, *Circulation*, 115(6), pp. 773–781. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.621185.

21. Curila, K. *et al.* (2009) ‘Low Prevalence and Variable Clinical Presentation of Troponin I and Troponin T Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 13(5), pp. 647–650. doi: 10.1089/gtmb.2009.0041.
22. Curila, K. *et al.* (2012) ‘Spectrum and clinical manifestations of mutations in genes responsible for hypertrophic cardiomyopathy’, *Acta Cardiologica*. Informa UK Limited, 67(1), pp. 23–29. doi: 10.1080/AC.67.1.2146562.
23. DePristo, M. A. *et al.* (2011) ‘A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data.’, *Nature genetics*, 43(5), pp. 491–8. doi: 10.1038/ng.806.
24. Dorn, G. W., McNally, E. M. and McNally, E. (2014) ‘Two strikes and you’re out: gene-gene mutation interactions in HCM.’, *Circulation research*. NIH Public Access, 115(2), pp. 208–10. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.304383.
25. Van Driest, S. L. *et al.* (2005) ‘Yield of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Mayo Clinic Proceedings*, 80(6), pp. 739–744. doi: 10.1016/S0025-6196(11)61527-9.
26. den Dunnen, J. T. *et al.* (2016) ‘HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update’, *Human Mutation*, 37(6), pp. 564–569. doi: 10.1002/humu.22981.
27. Elliott, P. M. *et al.* (2014) ‘2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy’, *European Heart Journal*. The Oxford University Press, 35(39), pp. 2733–2779. doi: 10.1093/eurheartj/ehu284.
28. Eriksson, M. J. *et al.* (2002) ‘Long-term outcome in patients with apical hypertrophic cardiomyopathy’, *Journal of the American College of Cardiology*. Journal of the American College of Cardiology, 39(4), pp. 638–645. doi: 10.1016/S0735-1097(01)01778-8.
29. *Exome Aggregation Consortium*. Dostupné z <http://exac.broadinstitute.org/>.
30. *Exome Sequencing Project*. Dostupné z <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>.
31. Fokstuen, S. *et al.* (2011) ‘Rapid detection of genetic variants in hypertrophic cardiomyopathy by custom DNA resequencing array in clinical practice.’, *Journal of medical genetics*, 48(8), pp. 572–6. doi: 10.1136/jmg.2010.083345.
32. Freitas, P. *et al.* (2019) ‘The amount of late gadolinium enhancement outperforms current guideline-recommended criteria in the identification of patients with hypertrophic cardiomyopathy at risk of sudden cardiac death’, *Journal of*



- Cardiovascular Magnetic Resonance*. BioMed Central Ltd., 21(1), p. 50. doi: 10.1186/s12968-019-0561-4.
33. Geisterfer-Lowrance, A. A. T. *et al.* (1990) ‘A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A  $\beta$  cardiac myosin heavy chain gene missense mutation’, *Cell*, 62(5), pp. 999–1006. doi: 10.1016/0092-8674(90)90274-I.
34. Gersh, B. J. *et al.* (2011) ‘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*. American Heart Association, Inc., pp. e783-831. doi: 10.1161/CIR.0b013e318223e2bd.
35. Gruner, C. *et al.* (2013) ‘Toronto hypertrophic cardiomyopathy genotype score for prediction of a positive genotype in hypertrophic cardiomyopathy.’, *Circulation Cardiovascular genetics*. American Heart Association, Inc., 6(1), pp. 19–26. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.112.963363.
36. Harris, K. M. *et al.* (2006) ‘Prevalence, clinical profile, and significance of left ventricular remodeling in the end-stage phase of hypertrophic cardiomyopathy’, *Circulation*, 114(3), pp. 216–225. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.583500.
37. Hershberger, R. E. *et al.* (2018) ‘Genetic Evaluation of Cardiomyopathy—A Heart Failure Society of America Practice Guideline’, *Journal of Cardiac Failure*, 24(5), pp. 281–302. doi: 10.1016/j.cardfail.2018.03.004.
38. Ho, C. Y. (2010) ‘Genetics and clinical destiny: Improving care in hypertrophic cardiomyopathy’, *Circulation*, pp. 2430–2440. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978924.
39. Ho, C. Y. *et al.* (2015) ‘Genetic advances in sarcomeric cardiomyopathies: State of the art’, *Cardiovascular Research*. Oxford University Press, pp. 397–408. doi: 10.1093/cvr/cvv025.
40. Ho, C. Y. *et al.* (2018) ‘Genotype and lifetime burden of disease in hypertrophic cardiomyopathy insights from the sarcomeric human cardiomyopathy registry (SHaRe)’, *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 138(14), pp. 1387–1398. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033200.
41. *Human Gene Mutation Database*. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
42. Ingles, J. *et al.* (2005) ‘Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling.’, *Journal of medical genetics*. BMJ Publishing Group, 42(10), p. e59. doi: 10.1136/jmg.2005.033886.

43. Ingles, J. *et al.* (2015) ‘Application of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy for Preclinical Disease Detection’, *Circulation: Cardiovascular Genetics*. American Heart Association, Inc., 8(6), pp. 852–859. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.115.001093.
44. Ingles, J. *et al.* (2017) ‘Nonfamilial Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Circulation: Cardiovascular Genetics*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 10(2). doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001620.
45. Ingles, J. *et al.* (2019) ‘Evaluating the Clinical Validity of Hypertrophic Cardiomyopathy Genes’, *Circulation: Genomic and Precision Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins Hagerstown, MD, 12(2), p. e002460. doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002460.
46. Jelsig, A. M. *et al.* (2017) ‘Novel ELN mutation in a family with supravalvular aortic stenosis and intracranial aneurysm’, *European Journal of Medical Genetics*. Elsevier Masson SAS, 60(2), pp. 110–113. doi: 10.1016/j.ejmg.2016.11.004.
47. Jensen, M. K. *et al.* (2013) ‘Penetrance of Hypertrophic Cardiomyopathy in Children and Adolescents’, *Circulation*, 127(1), pp. 48–54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.090514.
48. Kelly, M. and Semsarian, C. (2009) ‘Multiple mutations in genetic cardiovascular disease a marker of disease severity?’, *Circulation: Cardiovascular Genetics*. American Heart Association, Inc., pp. 182–190. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.108.836478.
49. Kitaoka, H. *et al.* (2003) ‘Comparison of prevalence of apical hypertrophic cardiomyopathy in Japan and the United States’, *American Journal of Cardiology*. Elsevier Inc., 92(10), pp. 1183–1186. doi: 10.1016/j.amjcard.2003.07.027.
50. Ko, C. *et al.* (2018) ‘Genetic testing impacts the utility of prospective familial screening in hypertrophic cardiomyopathy through identification of a nonfamilial subgroup’, *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 20(1), pp. 69–75. doi: 10.1038/gim.2017.79.
51. Li, H. and Durbin, R. (2010) ‘Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform’, *Bioinformatics*, 26(5), pp. 589–595. doi: 10.1093/bioinformatics/btp698.
52. Lopes, L. R. *et al.* (2015) ‘Novel genotype–phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy’, *Heart*, 101(4), pp. 294–301. doi: 10.1136/heartjnl-2014-306387.

53. Lopes, L. R. *et al.* (2019) 'Genetic characterization and genotype-phenotype associations in a large cohort of patients with hypertrophic cardiomyopathy – An ancillary study of the Portuguese registry of hypertrophic cardiomyopathy', *International Journal of Cardiology*. Elsevier, 278, pp. 173–179. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.12.012.
54. Maron, B. J. *et al.* (1982) 'Hypertrophic cardiomyopathy with ventricular septal hypertrophy localized to the apical region of the left ventricle (apical hypertrophic cardiomyopathy)', *The American Journal of Cardiology*. Excerpta Medica, 49(8), pp. 1838–1848. doi: 10.1016/0002-9149(82)90200-4.
55. Maron, B. J. *et al.* (2009) 'Sudden Deaths in Young Competitive Athletes: Analysis of 1866 Deaths in the United States, 1980-2006', *Circulation*, 119(8), pp. 1085–1092. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804617.
56. Maron, B. J. (2018) 'Clinical Course and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy', *New England Journal of Medicine*. Edited by D. L. Longo. Massachusetts Medical Society, 379(7), pp. 655–668. doi: 10.1056/NEJMra1710575.
57. Maron, B. J., Maron, Martin S and Semsarian, C. (2012) 'Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: Clinical perspectives', *Journal of the American College of Cardiology*, pp. 705–715. doi: 10.1016/j.jacc.2012.02.068.
58. Maron, B. J., Yeates, L. and Semsarian, C. (2011) 'Clinical challenges of genotype positive (+)phenotype negative (-) family members in hypertrophic cardiomyopathy', *American Journal of Cardiology*. Elsevier, 107(4), pp. 604–608. doi: 10.1016/j.amjcard.2010.10.022.
59. Mathew, J. *et al.* (2017) 'Utility of genetics for risk stratification in pediatric hypertrophic cardiomyopathy', *Clinical Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 93(2), pp. 310–319. doi: 10.1111/cge.13157.
60. Maurizi, N. *et al.* (2019) 'Clinical Course and Significance of Hypertrophic Cardiomyopathy Without Left Ventricular Hypertrophy', *Circulation*, 139(6), pp. 830–833. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.037264.
61. McNally, E. and Dellefave, L. (2009) 'Sarcomere mutations in cardiogenesis and ventricular noncompaction.', *Trends in cardiovascular medicine*, 19(1), pp. 17–21. doi: 10.1016/j.tcm.2009.03.003.
62. Meder, B. *et al.* (2011) 'Targeted Next-Generation Sequencing for the Molecular Genetic Diagnostics of Cardiomyopathies', *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 4(2), pp. 110–122. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.958322.

63. Mentias, A. *et al.* (2018) ‘Late Gadolinium Enhancement in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy and Preserved Systolic Function’, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA, 72(8), pp. 857–870. doi: 10.1016/j.jacc.2018.05.060.
64. Michels, M. *et al.* (2009) ‘Disease penetrance and risk stratification for sudden cardiac death in asymptomatic hypertrophic cardiomyopathy mutation carriers’, *European Heart Journal*, 30(21), pp. 2593–2598. doi: 10.1093/eurheartj/ehp306.
65. Mogensen, J. *et al.* (2003) ‘Idiopathic restrictive cardiomyopathy is part of the clinical expression of cardiac troponin I mutations.’, *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 111(2), pp. 209–16. doi: 10.1172/JCI16336.
66. Moolman, J. C. *et al.* (1997) ‘Sudden death due to troponin T mutations’, *Journal of the American College of Cardiology*, 29(3), pp. 549–555. doi: 10.1016/S0735-1097(96)00530-X.
67. Morita, H. *et al.* (2008) ‘Shared Genetic Causes of Cardiac Hypertrophy in Children and Adults’, *New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society , 358(18), pp. 1899–1908. doi: 10.1056/NEJMoa075463.
68. Murphy, S. L. *et al.* (2016) ‘Evaluation of the Mayo Clinic Phenotype-Based Genotype Predictor Score in Patients with Clinically Diagnosed Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 9(2), pp. 153–161. doi: 10.1007/s12265-016-9681-5.
69. Nagueh, S. F. *et al.* (2011) ‘American Society of Echocardiography Clinical Recommendations for Multimodality Cardiovascular Imaging of Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Journal of the American Society of Echocardiography*, 24(5), pp. 473–498. doi: 10.1016/j.echo.2011.03.006.
70. Newman, R. *et al.* (2018) ‘Hypertrophic Cardiomyopathy Genotype Prediction Models in a Pediatric Population’, *Pediatric Cardiology*. Springer New York LLC, 39(4), pp. 709–717. doi: 10.1007/s00246-018-1810-2.
71. Nguyen, K. *et al.* (2019) ‘Whole Exome Sequencing Reveals a Large Genetic Heterogeneity and Revisits the Causes of Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Circulation. Genomic and precision medicine*. NLM (Medline), p. e002500. doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002500.
72. O’Mahony, C. *et al.* (2018) ‘International external validation study of the 2014 European society of cardiology guidelines on sudden cardiac death prevention in

- hypertrophic cardiomyopathy (EVIDENCE-HCM)', *Circulation*. Lippincott Williams and Wilkins, 137(10), pp. 1015–1023. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030437.
73. Olivotto, I. *et al.* (2008) 'Myofilament Protein Gene Mutation Screening and Outcome of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy', *Mayo Clinic Proceedings*, 83(6), pp. 630–638. doi: 10.4065/83.6.630.
74. *Online Mendelian Inheritance in Man* ®. Dostupné z [www.omim.org](http://www.omim.org).
75. *Orphanet*. Dostupné z <https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>.
76. Östman-Smith, I. *et al.* (2008) 'Age- and gender-specific mortality rates in childhood hypertrophic cardiomyopathy', *European Heart Journal*, 29(9), pp. 1160–1167. doi: 10.1093/eurheartj/ehn122.
77. Page, S. P. *et al.* (2012) 'Cardiac myosin binding protein-C mutations in families with hypertrophic cardiomyopathy: Disease expression in relation to age, gender, and long term outcome', *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 5(2), pp. 156–166. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.960831.
78. Papadopoulou, L. C. *et al.* (1999) 'Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene', *Nature Genetics*. Nature Publishing Group, 23(3), pp. 333–337. doi: 10.1038/15513.
79. Perrot, A. *et al.* (2016) 'Mutations in NEBL encoding the cardiac Z-disk protein nebulin are associated with various cardiomyopathies', *Archives of Medical Science*. Termedia Publishing House Ltd., 12(2), pp. 263–278. doi: 10.5114/aoms.2016.59250.
80. Priori, S. G. *et al.* (2015) '2015 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death', *Europace*, 17(11), p. euv319. doi: 10.1093/europace/euv319.
81. Rapezzi, C. *et al.* (2013) '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', *European Heart Journal*, 34(19), pp. 1448–1458. doi: 10.1093/eurheartj/ehs397.
82. Richard, P. *et al.* (2003) 'Hypertrophic cardiomyopathy: Distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy', *Circulation*, 107(17), pp. 2227–2232. doi: 10.1161/01.CIR.0000066323.15244.54.
83. Richards, S. *et al.* (2015) 'Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology', *Genetics in*

- Medicine*. NIH Public Access, 17(5), pp. 405–423. doi: 10.1038/gim.2015.30.
84. Rigopoulos, A. G. *et al.* (2019) ‘Advances in the diagnosis and treatment of transthyretin amyloidosis with cardiac involvement’, *Heart Failure Reviews*, 24(4), pp. 521–533. doi: 10.1007/s10741-019-09776-3.
85. Rowin, E. J. *et al.* (2014) ‘Advanced heart failure with preserved systolic function in nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy under-recognized subset of candidates for heart transplant’, *Circulation: Heart Failure*. Lippincott Williams and Wilkins, 7(6), pp. 967–975. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001435.
86. Ryan, M. P. *et al.* (1995) ‘The standard electrocardiogram as a screening test for hypertrophic cardiomyopathy’, *The American Journal of Cardiology*. Excerpta Medica, 76(10), pp. 689–694. doi: 10.1016/S0002-9149(99)80198-2.
87. Sabater-Molina, M. *et al.* (2018) ‘Genetics of hypertrophic cardiomyopathy: A review of current state’, *Clinical Genetics*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), pp. 3–14. doi: 10.1111/cge.13027.
88. Seidman, C. E. and Seidman, J. G. (2011) ‘Identifying Sarcomere Gene Mutations in Hypertrophic Cardiomyopathy’, *Circulation Research*. Edited by J. Robbins and H. Watkins, 108(6), pp. 743–750. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223834.
89. Semsarian, C. *et al.* (2015) ‘New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy’, *Journal of the American College of Cardiology*, pp. 1249–1254. doi: 10.1016/j.jacc.2015.01.019.
90. *Sorting Intolerant From Tolerant* (no date). Available at: <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>.
91. Štěchovský, C., Adla, T. and Bonaventura, J. (2019) ‘Clinical perspective on the myocarditis and cardiomyopathies.’, *Ceskoslovenska patologie*, 55(4), pp. 209–217. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31842551> (Accessed: 21 March 2020).
92. Stenson, P. D. *et al.* (2003) ‘Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update.’, *Human mutation*, 21(6), pp. 577–81. doi: 10.1002/humu.10212.
93. Thomson, K. L. *et al.* (2018) ‘Analysis of 51 proposed hypertrophic cardiomyopathy genes from genome sequencing data in sarcomere negative cases has negligible diagnostic yield’, *Genetics in Medicine*. doi: 10.1038/s41436-018-0375-z.
94. Varnava, A. M. *et al.* (2001) ‘Hypertrophic cardiomyopathy: Histopathological features of sudden death in cardiac troponin T disease’, *Circulation*. Lippincott Williams & Wilkins, 104(12), pp. 1380–1384. doi: 10.1161/hc3701.095952.
95. van Velzen, H. G. *et al.* (2016) ‘Value of Genetic Testing for the Prediction of Long-

- Term Outcome in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy’, *American Journal of Cardiology*. Elsevier Inc., 118(6), pp. 881–887. doi: 10.1016/j.amjcard.2016.06.038.
96. Veselka, J. *et al.* (2009) ‘Real-time myocardial contrast echocardiography for echo-guided alcohol septal ablation’, *Archives of Medical Science*, 5(2), pp. 271–272.  
Available at:  
<https://search.proquest.com/openview/48f014116a04310943cd4a7b476284a1/1?pq-origsite=gscholar&cbl=696359> (Accessed: 21 April 2019).
97. Veselka, J. *et al.* (2014) ‘Early outcomes of alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy: A European multicenter and multinational study’, *Catheterization and Cardiovascular Interventions*. John Wiley & Sons, Ltd, 84(1), pp. 101–107. doi: 10.1002/ccd.25236.
98. Veselka, J., Jensen, M. K., Liebrechts, M., Januska, J., Krejci, J., Bartel, T., Dabrowski, M., Hansen, P. R., Almaas, V. M., *et al.* (2016) ‘Long-term clinical outcome after alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy: Results from the Euro-ASA registry’, *European Heart Journal*. Oxford University Press, 37(19), pp. 1517–1523. doi: 10.1093/eurheartj/ehv693.
99. Veselka, J., Jensen, M. K., Liebrechts, M., Januska, J., Krejci, J., Bartel, T., Dabrowski, M., Hansen, P. R., Bundgaard, H., *et al.* (2016) ‘Low procedure-related mortality achieved with alcohol septal ablation in European patients’, *International Journal of Cardiology*. Elsevier, 209, pp. 194–195. doi: 10.1016/J.IJCARD.2016.02.077.
100. Veselka, J., Tomašov, P., *et al.* (2016) ‘Obstruction after alcohol septal ablation is associated with cardiovascular mortality events’, *Heart*. BMJ Publishing Group Ltd and British Cardiovascular Society, 102(22), pp. 1793–1796. doi: 10.1136/heartjnl-2016-309699.
101. Veselka, J. *et al.* (2018) ‘Effect of Institutional Experience on Outcomes of Alcohol Septal Ablation for Hypertrophic Obstructive Cardiomyopathy’, *Canadian Journal of Cardiology*, 34(1), pp. 16–22. doi: 10.1016/j.cjca.2017.10.020.
102. Veselka, J. *et al.* (2019) ‘Short- and long-term outcomes of alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy in patients with mild left ventricular hypertrophy: a propensity score matching analysis’, *European Heart Journal*, 40(21), pp. 1681–1687. doi: 10.1093/eurheartj/ehz110.
103. Veselka, J., Anavekar, N. S. and Charron, P. (2017) ‘Hypertrophic obstructive cardiomyopathy’, *The Lancet*. Elsevier, 389(10075), pp. 1253–1267. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31321-6.

104. Veselka, J., Polaková, E. and Bonaventura, J. (2019) 'Update on alcohol septal ablation for hypertrophic obstructive cardiomyopathy', *Kardiologia Polska*, 77(2), pp. 160–161. doi: 10.5603/KP.2019.0019.
105. Veselka, J., Tomasov, P. and Zemanek, D. (2012) 'Mid-term outcomes of alcohol septal ablation for obstructive hypertrophic cardiomyopathy in patients with sigmoid versus neutral ventricular septum.', *The Journal of invasive cardiology*, 24(12), pp. 636–640. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220977> (Accessed: 3 January 2018).
106. Walsh, R., Buchan, R., *et al.* (2017) 'Defining the genetic architecture of hypertrophic cardiomyopathy: re-evaluating the role of non-sarcomeric genes.', *European heart journal*, 38(46), pp. 3461–3468. doi: 10.1093/eurheartj/ehw603.
107. Walsh, R., Thomson, K. L., *et al.* (2017) 'Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples', *Genetics in Medicine*. Nature Publishing Group, 19(2), pp. 192–203. doi: 10.1038/gim.2016.90.
108. Wells, S. *et al.* (2018) 'Clinical Profile of Nonresponders to Surgical Myectomy with Obstructive Hypertrophic Cardiomyopathy', *American Journal of Medicine*. Elsevier Inc., 131(6), pp. e235–e239. doi: 10.1016/j.amjmed.2017.12.031.
109. Whiffin, N. *et al.* (2017) 'Using high-resolution variant frequencies to empower clinical genome interpretation', *Genetics in Medicine*, 19(10), pp. 1151–1158. doi: 10.1038/gim.2017.26.
110. Yamaguchi, H. *et al.* (1979) 'Hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy with giant negative T waves (apical hypertrophy): Ventriculographic and echocardiographic features in 30 patients', *The American Journal of Cardiology*. Excerpta Medica, 44(3), pp. 401–412. doi: 10.1016/0002-9149(79)90388-6.
111. Yogasundaram, H. *et al.* (2017) 'Clinical Features, Diagnosis, and Management of Patients With Anderson-Fabry Cardiomyopathy', *Canadian Journal of Cardiology*, 33(7), pp. 883–897. doi: 10.1016/j.cjca.2017.04.015.
112. Zemanek, D. *et al.* (2015) 'Comparison of sublingual isosorbide dinitrate and Valsalva maneuver for detection of obstruction in hypertrophic cardiomyopathy', *Archives of Medical Science*. 11(4), pp. 751–755. doi: 10.5114/aoms.2015.47096.