

**Univerzita Karlova v Praze**

3. lékařská fakulta

Studijní program: Fyziologie a patofyziologie člověka

Disertační práce

**Genetické a klinické koreláty u hypertrofické  
kardiomyopatie**

**Autor: MUDr. Karol Čurila**

**Školitel: Prof. MUDr. Pavel Gregor, DrSc.**

**Praha, 2011**

„Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracoval samostatně, a že jsem vyznačil prameny, z nichž jsem pro svou práci čerpal způsobem ve vědecké práci obvyklým.“

Praha, Říjen, 2011

Podpis:

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval Prof. Pavlu Gregorovi a Doc. Martinovi Pěničkovi za užitečné rady a připomínky při naplňování cílů postgraduálního studia. Dále chci poděkovat celému kolektivu echokardiografické laboratoře Kardiologické kliniky 3. LF UK a FNKV a genetické laboratoře Genomac s.r.o za výbornou spolupráci a podporu v mém úsilí.

## Obsah

1. Úvod do problematiky.....	1
2. Přehled cílů PGS studia.....	12
3. Metodika.....	13
3.1 Fyzikální a echokardiografické vyšetření .....	13
3.2 Genetické vyšetření .....	15
3.3 Statistická analýza .....	16
4. Dosažené výsledky .....	17
4.1 Zastoupení mutací u nemocných s HKMP .....	17
4.2. Genotyp - fenotypové koreláty u HKMP .....	21
4.2.1 Klinický obraz .....	21
4.2.2 Echokardiografické parametry .....	22
4.2.3 Výskyt supraventrikulárních a komorových arytmií ..	25
4.3 Vliv candesartanu na hypertrofii levé komory srdeční u pacientů s neobstruktivní formou HKMP .....	26
5. Diskuze .....	29
6. Závěr .....	38
7. Seznam použité literatury.....	40
8. Přehled publikací vztahujících se k náplni PGS studia ...	47
9. Publikace vztahující se k náplni PGS studia přiložené in extenso .....	48-79

## 1. Úvod do problematiky

Hypertrofická kardiomyopatie (HKMP) je onemocnění, pro které je charakteristické zbytnění myokardu septa a/nebo levé komory, porucha diastolického plnění a v některých případech i systolická obstrukce ve výtokovém traktu levé, popřípadě pravé komory (1). Ztluštění stěny levé komory je spojeno s nedilatovanými a hyperkinetickými srdečními oddíly, při nepřítomnosti jiné srdeční či systémové choroby jako je např. hypertenzní nemoc nebo chlopenní vada (2). I když mezi hlavní diagnostická kritéria patří echokardiograficky prokázaná minimální tloušťka stěn levé komory srdeční o velikosti 15mm u mužů a 13mm u žen, v současnosti víme, že prakticky jakákoliv tloušťka stěn myokardu při přítomnosti pozitivního genotypu může být spojena s HKMP (3,4). Je velice důležité odlišit hraniční tloušťku stěn levé komory srdeční (13-14mm) při HKMP od stavů, které mohou fyziologicky navozovat výše uvedenou mírnou hypertrofií - jako je tomu např. u tzv. 'atletického srdce' (5).

Dřívější práce odvozené ze studia malých, selektovaných skupin pacientů s HKMP předpokládaly, že tato nemoc je relativně vzácná a zároveň extrémně nebezpečná - s roční mortalitou v rozsahu 2-4% u dospělých jedinců a 6% mortalitou u dětí. Velká většina úmrtí měla být náhlá (6,7,8). V současnosti je jasné, že HKMP není ani tak vzácná, ani tak nebezpečná, jak uváděly tyto dřívější práce. Epidemiologické studie v různých populacích prokázaly shodný výskyt fenotypového obrazu HKMP v dospělé populaci na úrovni přibližně 0,2% (1 z 500 dospělých jedinců) (9,10). Proto již o HKMP nemluvíme jako o vzácné, ale jako o nejčastější monogenní geneticky podmíněné nemoci. Je však pravdou, že nízký výskyt této nemoci v běžné kardiologické praxi - kolem 1% pacientů referovaných k echokardiografickému vyšetření (11) je způsoben tím, že

velká část nemocných je bez potíží, a tím uniká klinické diagnóze. Také je zřejmé, že HKMP je v podstatě benigní nemoc s roční mortalitou pod 1%, s tím, že jenom přibližně polovina úmrtí je náhlá a zbytek úmrtí je v důsledku srdečního selhání nebo mozkové příhody (12).

HKMP je onemocnění charakterizované velkou genotypovou a fenotypovou heterogenitou. Je pro něj typické, že hypertrofie myokardu nebývá přítomná při narození postiženého jedince a k jejímu rozvoji dojde zpravidla v průběhu života, nejčastěji v období adolescence (13). U některých forem však pozorujeme hypertrofii myokardu až ve středním nebo vyšším věku (14). Mnoho pacientů s HKMP je odesláno ke kardiologickému vyšetření na základě patologického EKG nálezu, který bývá přítomen u 75-95% nemocných (15) a někdy předchází hypertrofii myokardu či rozvoji klinických příznaků (16). K definitivnímu stanovení diagnózy HKMP pak běžně používáme echokardiografické vyšetření, kde prokazujeme idiopatickou hypertrofii myokardu levé komory nad 15mm u mužů resp. 13mm u žen (17). Asi u 30% nemocných je kromě hypertrofie myokardu přítomná i dynamická obstrukce ve výtokovém traktu levé komory, tzv. obstruktivní HKMP. Následkem této obstrukce je gradient ve výtokovém traktu levé komory (LVOTG) a pacienti s LVOTG nad 30mm Hg se od ostatních nemocných s HKMP liší nejenom echokardiografickým obrazem, ale i závažnější symptomatologií, častějším rozvojem srdečního selhání a vyšší roční mortalitou (18). Existuje skupina pacientů u kterých při klidovém echokardiografickém vyšetření neprokážeme žádný, popř. jenom mírný, gradient ve výtokovém traktu levé komory srdeční. Jeho přítomnost je prokázatelná teprve při provokačních testech (nitráty, dobutamin) či při fyzické zátěži (zátěžové echokardiografické vyšetření). Tito pacienti jsou klasifikováni jako nemocní s tzv. latentní formou obstruktivní HKMP. Provedení provokačních testů zvyšuje výskyt patologického gradientu ve výtokovém

traktu levé komory na 60-70% pacientů s HKMP (19) a to má velký význam pro diagnostiku a posléze léčbu symptomatických jedinců. Méně častá je obstrukce ve střední části levé komory na úrovni papilárních svalů, kdy mluvíme o tzv. midventrikulární formě HKMP.

Bohužel i v dnešní době se často stává, že diagnóza HKMP je stanovena až patologem při pitvě. Typický je nález hypertrofie myokardu a tzv. disarray (dezorganizace) kardiomyocytů. Hypertrofie svalových vláken může nabývat značných rozměrů - někdy lze nalézt až 6-ti násobné ztlustění (20). Mezi další, již méně specifické známky HKMP, patří poměrně rozsáhlá fibróza myokardu a změny stavby stěn drobných intramyokardiálních artérií.

Důvodem častého nerozpoznání HKMP bývá fakt, že klinický obraz postižených jedinců je velice různorodý. Na jednom konci spektra jsou pacienti zcela asymptomatictí a pacienti s nízkým rizikem náhlé smrti, na druhém konci pak nemocní s projevy levostranné kardiální insuficience a jedinci umírající náhlou smrtí. Nejčastější klinické projevy HKMP jsou: námahová dušnost, stenokardie, palpitace a synkopy, přičemž tyto symptomy bývají většinou přítomny až ve stádiu echokardiograficky prokázatelné hypertrofie myokardu. Bohužel prvním příznakem HKMP bývá někdy náhlé úmrtí a dle dosavadních poznatků je HKMP nejčastější příčinou náhlé smrti u lidí do 30-ti let (21).

V současnosti je známo několik rizikových faktorů, které jsou u HKMP spojené s vyšším rizikem náhlé smrti. Tyto rizikové faktory se dělí na 'velké' a 'malé' jak je vidět v tab. 1 (22).

Tab 1. Rizikové faktory náhlé smrti u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií.

<b>Velké rizikové faktory</b>	Srdeční zástava v anamnéze Familiární výskyt náhlé smrti Maligní, nebo dvojitá mutace Synkopa v důsledku srdeční arytmie Přetrvávající a opakovaná nepřetrvávající komorová tachykardie Těžká srdeční hypertrofie	Velká část pacientů s HKMP tyto rizikové faktory nemá a riziko náhlého úmrtí v této skupině je menší než 1%. Ale i
<b>Malé rizikové faktory</b>	Hypotenze při zátěži Obstrukce ve výtokovém traktu levé komory srdeční Těžká fibróza a myokardiální disarray Klinická manifestace v mladém věku Ischémie myokardu	přítomnost jednoho rizikového faktoru znamená obvykle nízkou pozitivní a různě velkou negativní.

prediktivní hodnotu náhlého úmrtí (23, 24). Proto již nyní používáme ke stratifikaci rizika náhlé smrti kombinaci více rizikových faktorů. Pacienti s kombinací 2 a více 'velkých' rizikových faktorů mají výrazně nižší 6-roční šanci přežití oproti těm s 1 nebo bez rizikového faktoru. Avšak přítomnost 2 a více rizikových faktorů má stále jenom 23% pozitivní prediktivní hodnotu náhlé smrti během střednědobého pozorování (24).

Proto se pozornost obrátila na jiné, nové možnosti stratifikace rizika náhlé smrti u pacientů s HKMP. Jak již bylo zmíněno, HKMP je onemocnění vznikající v důsledku mutace genetického kódu. V současnosti existuje jediná metoda, která je schopná se 100% specifitou odhalit nositele mutace ještě



před manifestací hypertrofie myokardu - a tou je genetické vyšetření. Vzhledem k tomu, že u HKMP byl pozorován familiární výskyt onemocnění, již od počátku se předpokládalo genetické pozadí této nemoci. Lokalizace mutovaného genu způsobujícího HKMP zůstala záhadou až do konce 80-tých let 20. století. V roce 1989 Jarcho a spol. prokázali spojitost mezi výskytem HKMP a lokusem lokalizovaným na dlouhém raménku 14. chromozomu (25). Předpokládali, že kandidátním genem odpovědným za rozvoj HKMP je jeden z genů pro řetězce beta-myozinu nebo pro protein tepelného šoku. Jeho přesná identifikace na sebe nenechala dlouho čekat, protože již o rok později Salomon a spol. zjistili, že právě gen pro řetězce beta-myozinu je odpovědný za familiární formu HKMP (26). Tento náález vyvolal velká očekávání, protože při znalosti kandidátního genu stačilo určit přesnou lokalizaci mutace pomocí PCR a přímé sekvenace. Následně by již nic nestálo v cestě využití genetických metod jak při přímé diagnostice HKMP, tak i v genetickém poradenství a event. i prenatální diagnostice.

Situace se však velice rychle zkomplikovala. Ještě v stejném roce se ukázalo, že nejméně u dalších 2 rodin trpících HKMP, se gen odpovědný za vznik nemoci nenachází na dlouhém raménku 14. chromozomu (27). Byla vyslovena hypotéza, že HKMP může být způsobena mutacemi ve 2 odlišných genech, které kódují rozdílné bílkoviny podobné funkce. Protože víme, že beta-myozin je bílkovina vyskytující se v sarkomeře svalstva, další pozornost se zaměřila na její ostatní komponenty. Postupně byly identifikovány i ostatní geny (resp. bílkoviny jako jejich produkty) odpovědné za vznik HKMP. V tabulce 2. uvádíme jejich přehled (28).

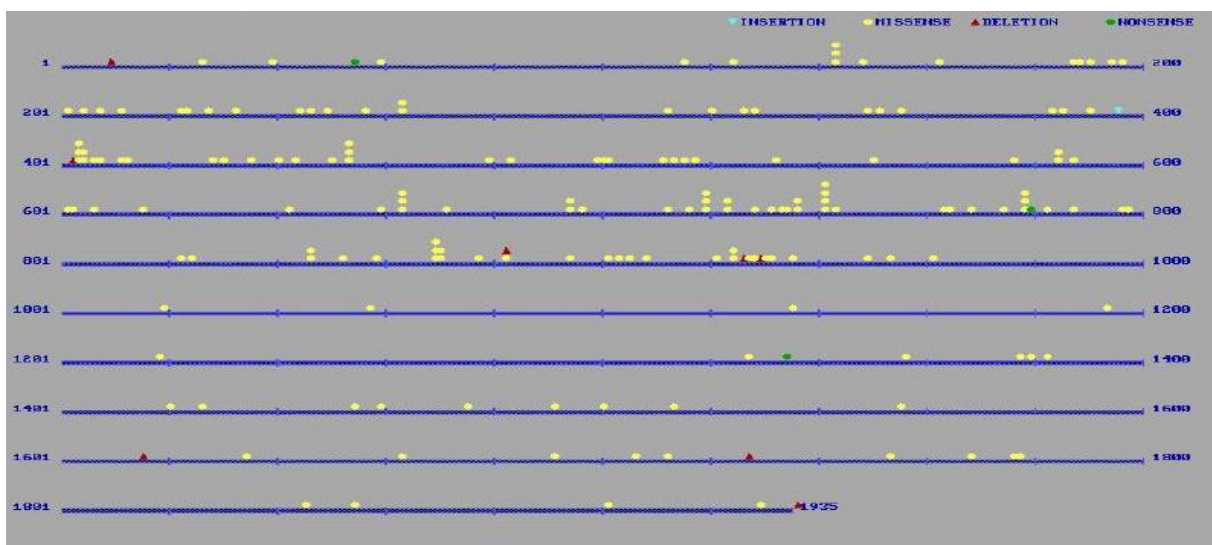
Tab. 2: Geny odpovědné za vznik HKMP.

<b>Protein a zkratka genu</b>	<b>Lokus</b>	<b>Složka sarkomery</b>	<b>Frekvence</b>
Těžký řetězec beta-myozinu (MYH7)	14q12	Tlustá filamenta	44%
Myozinový vazebný protein C (MYPBC3)	11p11.2	Tlustá filamenta	35%
Troponin T (TNNT2)	1q32	Tenké filamenta	7%
Troponin I (TNNI3)	19p13.4	Tenké filamenta	5%
Alfa-tropomyozin (TPM1)	15q22.1	Tenké filamenta	2,5%
Regulační podjednotka lehkého řetězce myozinu (MYL2)	12q24.3	Tlustá filamenta	2%
Esenciální podjednotka lehkého řetězce myozinu (MYL3)	3p21	Tlustá filamenta	1%
Aktin (ACTC)	15q14	Tenká filamenta	1%
Titin (TTN)	2q31	Tlustá filamenta	<1%
Svalový LIM protein (CSRP3)	11p15.1	Z-disk	<1%
Telethonin (TCAP)	2q24.3	Z-disk	<1%
Myozenin 2 (MYOZ2)	7q36	Z-disk	<1%
Vinculin (VCL)	14q11.2	Interkalární disk	<1%

V současnosti víme o více než 450 mutacích vyskytujících se ve výše zmíněných genech, přičemž žádná z mutací se nezdá být převažující. Největší počet mutací byl zjištěn v genu pro těžké řetězce beta myozinu a v genu pro vazebný protein C, přičemž se pořád objevují mutace nové, dosud neznámé.

Rozložení mutací v rámci genu je nerovnoměrné. Existují místa s jejich koncentrací a naopak existují úseky, kde doposud nebyla popsána mutace ani jedna. Jako příklad uvádíme mutační mapu pro těžký řetězec beta-myozínu na Obr. 1.

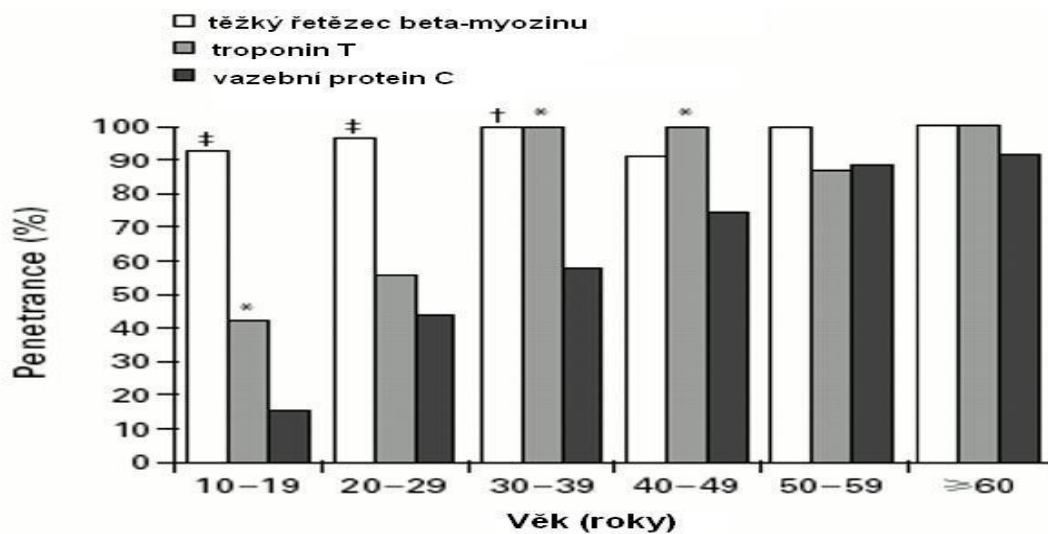
Obr. 1: Mutační mapa těžkého řetězce beta-myozinu.



Tento poznatek, jak se zdá, může mít význam pro porozumění genotypově-fenotypových vztahů u HKMP. Již před érou genetiky bylo jasné, že známky onemocnění jako je míra hypertrofie, čas manifestace příznaků a zejména riziko náhlé smrti jsou u dvou postižených jedinců odlišné. Spolu s definováním kandidátních genů bylo opravdu zjištěno, že některé projevy nemoci závisí na postiženém genu. Jedním z fenotypových projevů, který je dle dosavadních údajů závislý na mutovaném genu, je věk nástupu hypertrofie myokardu. Na grafu č. 1 je vidět, že mezi 20. až 30. rokem života má téměř 100% nositelů mutace v MYH7 echokardiograficky detekovatelnou hypertrofii myokardu. U nositelů mutace v genu pro vazebný protein C je jejich

zastoupení jenom 40%. Říkáme tedy, že mutace v genu pro vazebný protein C mají nízkou penetranci v mladém věku a neúplná penetrance přetrvává až do vysokých věkových skupin (3).

Graf 1: Vztah věku a přítomnosti hypertrofie levé komory srdeční u HKMP.

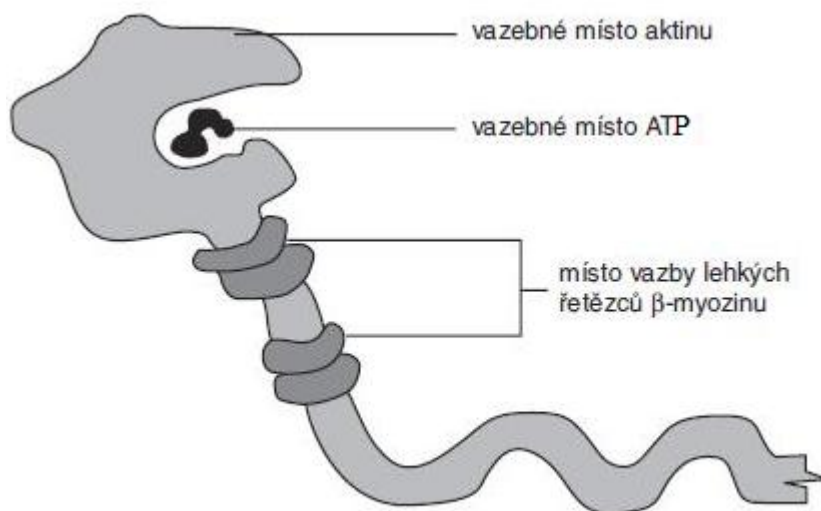


Dalším fenotypovým projevem, který je alespoň zčásti závislý na mutovaném genu, je míra hypertrofie myokardu. Mutace v genu pro těžký řetězec beta myozinu jsou spojeny s výraznější hypertrofií myokardu, kdežto u mutací v troponinu T a vazebném proteinu C je míra hypertrofie zpravidla menší (3,29). Původně často zastoupený názor, že dle mutovaného genu lze předpovědět riziko náhlého úmrtí, ve velké většině případů v současnosti neplatí. Obecně se udává, že mutace v genu pro vazebný protein C se projeví nízkým rizikem náhlé smrti a dobrou prognózou (3), proto se označují jako benigní. Naopak mutace genu pro troponin T jsou označovány jako maligní pro vysoké riziko náhlé smrti i při malé, často hraniční, hypertrofii myokardu (4). V těžkém řetězci beta-myozinu se však vyskytují jak

mutace s benigním, tak i maligním fenotypem. Zjistilo se, že některé jsou spojeny s téměř normální délkou života (Val606Met, Leu908Val), zatímco jiné představují pro nositele zvýšené riziko náhlé smrti či srdečního selhání (Arg403Gln, Arg453Cys) (30,31).

Těžký řetězec beta myozinu je jakýmsi hnacím motorem svalové kontrakce na molekulární úrovni. Obsahuje tzv. funkční doménu - t.j. místo vazby ATP, jehož rozštěpením dochází k aktin-myozinové interakci a následně svalové kontrakci. Kromě této domény obsahuje i několik dalších, jak je uvedeno na obr. 2 (32). Mutace postihují různá místa molekuly beta myozinu - jak funkční domény tak i ostatní 'nefunkční místa'. Jejich následkem je inkorporace abnormální aminokyseliny do polypeptidu. Záměna i jediné aminokyseliny dokáže změnit strukturu celé bílkoviny a následně může vést k poškození sarkomery a kontraktilní dysfunkci srdečního svalu.

Obr. 2: Schéma molekuly beta-myozinu.



Zda se daná mutace projeví maligně nebo benigně nezávisí jenom na postiženém genu, ale také na umístění mutace a zejména na záměně aminokyseliny kodované mutovaným genem (33). To znamená, že mutace zasahující tzv. aktivní místa bílkovinné struktury těžkého řetězce beta-myozinu (místo vazby s vazebným proteinem C, místo štěpení ATP, atd.) způsobí vážnější poruchu struktury a funkce sarkomery srdečního svalu, a tím i zhoršení fenotypového projevu. Tato porucha bude ještě více zvýrazněna, když nová, 'mutovaná', aminokyselina bude mít jiný elektrický náboj než aminokyselina původní (33). Příčinou horší prognózy a výrazných klinických projevů u HKMP nemusí být jenom změna aminokyseliny na citlivém místě polypeptidu. Může ji způsobit i koincidence dvou mutací v genech pro HKMP. Tyto se dle dosavadních poznatků vyskytují u 2-5% jedinců a jsou spojeny s větší mírou hypertrofie, závažnějšími klinickými příznaky a vyšším rizikem náhlé smrti (34).

Využití molekulárně genetických metod u nemocných s HKMP a jejich příbuzných je v současnosti předmětem diskuzí. Problémem je kromě vysoké finanční a časové náročnosti těchto metod i neúplná penetrance genotypu. To znamená, že klinický projev dané mutace záleží i na jiných než genetických faktorech. Příkladem může být různý klinický obraz postižených jedinců v rámci jedné rodiny. Vysvětlením této různorodosti je jednak vliv faktorů vnějšího prostředí (např. rozdílné tlakové zatížení levé komory při fyzické zátěži, vliv životního stylu a diety), nebo přítomnost genových polymorfizmů modifikujících klinický obraz HKMP. Tyto modifikující geny nejsou samy o sobě schopné onemocnění vyvolat, avšak jejich přítomnost může významně ovlivnit závažnost postižení myokardu (35). Patří mezi ně polymorfizmy genů pro angiotenzin konvertující enzym, angiotensinový receptor typu 1, endotelin a TNF alfa (36). Jak přesně tyto různé faktory ovlivňují výsledný fenotyp u jedince s HKMP není v současnosti dostatečně prozkoumáno. Je tomu tak

z důvodu, že detailním genotypově-fenotypovým korelačním studiím brání zejména nízká frekvence jednotlivých mutací v populaci. Proto jsou všechny naše poznatky z této oblasti založené na sledování menšího počtu mutací v nejčastěji se vyskytujících genech nebo ze studií na zvířecích modelech s HKMP (37,38).

Do dnešní doby v ČR neproběhl kompletní genetický screening hlavních genů zodpovědných za HKMP. Proto není známa frekvence výskytu mutací jednotlivých genů v české populaci pacientů postižených HKMP, ani vztah mezi specifickými mutacemi, klinickým průběhem, echokardiografickým nálezem a typem arytmií. Také není jasné, zda lze s pomocí farmak docílit zmírnění příznaků onemocnění a zlepšení kvality a délky života postižených jedinců.

## **2. Přehled cílů PGS studia**

Cíle:

- 1) Zjistit zastoupení mutací v 4 nejčastějších genech u nemocných s HKMP
- 2) Určit vztah mezi genovou mutací (případně kombinací několika mutací), klinickým obrazem, morfologickými a funkčními parametry a výskytem supraventrikulárních a komorových arytmií u postižených jedinců
- 3) Sledovat efekt užívání blokátoru AT-1 receptorů na morfologické a klinické charakteristiky pacientů s HKMP



### 3. Metodika

#### 3.1 Fyzikální a echokardiografické vyšetření

V průběhu let 2005–2009 proběhlo na Kardiologické klinice FNKV a 3.LF UK a v Kardiovaskulárním centru FN Motol vyšetření 100 pacientů s HKMP a 100 zdravých dobrovolníků bez hypertrofie levé komory srdeční. Jako jedinci s HKMP byly označeni ti, který mají hypertrofii stěny levé komory srdeční bez známé příčiny (min. 13 mm) současně s patologickým EKG. Vyřazovacím kritériem byla přítomnost jiného přidruženého onemocnění, které by mohlo vést k zbytnění levé komory (např. systémová hypertenze, závažné postižení aortální chlopně a.j.). Všichni účastníci výzkumu podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí FNKV a Etickou komisí 3. LF UK v Praze. U všech subjektů zařazených do studie bylo provedeno fyzikální, EKG a echokardiografické vyšetření a následně odběr genetického materiálu.

Klinické vyšetření zahrnovalo podrobnou anamnézu a záznam o výskytu palpitací, synkop. Výskyt dušnosti a stenokardií byl hodnocen dle zaužívané klasifikace NYHA a CCS. U všech pacientů byl proveden klidový 12 - svodový EKG záznam a holterovská monitorace EKG. Během ní byl sledován především výskyt supraventrikulárních a komorových arytmií.

Echokardiografické vyšetření bylo provedeno ze standardních parasternálních a apikálních projekcí (39). Rozměry levé komory a levé síně byly změřeny z M-modu v parasternální projekci na dlouhou osu. Rozsah hypertrofie levé komory srdeční byl posuzován v 16 segmentech levé komory. Její hmotnost byla hodnocena standardně dle vzorce:  $1.04 \times ((LVEDd+PW+SW) \times (LVEDd+PW+SW) \times (LVEDd+PW+SW) - LVEDd \times LVEDd \times LVEDd) - 13.6$ . Ejekční frakce levé komory a frakcionované

zkrácení byly hodnoceny Teicholzovou metodou a mitrální insuficience byla hodnocena na 0-4 stupňové škále pomocí vizuálního posouzení barevně kódované plochy regurgitačního jetu (39). Za pacienty s obstrukcí ve výtokovém traktě levé komory srdeční byli považováni ti s gradientem v LVOT  $\geq 30$  mm Hg.

Do podstudie, která se zabývala testováním efektu candesartanu byly zařazeni pouze ti pacienti s HKMP, kteří měli minimální hypertrofi myokardu větší než 15mm, neměli prokázáný gradient ve výtokovém traktě levé, popř. pravé komory, neměli anamnézu fibrilace síní a dosud' neužívali inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACE-i) či blokátory angiotensinového receptoru typu 1 (AT-1 blokátory). Současně tito jedinci nesměli trpět ischemickou chorobou srdeční, renálním či hepatálním selháním nebo jinou závažnou nemocí, která by mohla zkracovat délku jejich života. Při vstupu do sledování bylo 24 pacientů rozděleno do 2 stejných skupin; v první skupině všech 12 užívalo candesartan, ve druhé placebo. Iniciální dávka léku byla 8mg denně a po 2 týdnech byla v případě tolerance navýšena na dvojnásobek s cílovou dávkou 32mg denně. Pacienti byli klinicky sledováni za 3,6 a 12 měsíců poté, co bylo dosaženo maximální dávky léku. Kromě klinických projevů byl také sledován výskyt komorových arytmií pomocí holterovské monitorace EKG, tolerance zátěže při ergometrii a velikost hypertrofie či přítomnost obstrukce ve výtokovém traktu levé komory srdeční pomocí dvourozměrné-rozměrné a dopplerovské echokardiografie.

### 3.2 Genetické vyšetření

Genetická vyšetření probíhala na pracovišti Laboratoře molekulární genetiky, Genomac International, s.r.o. v Praze. Vzorky nesrážlivé krve byly do laboratoře dopravovány z obou klinických pracovišť v zamraženém stavu. Genetická část projektu byla zaměřena na mutační analýzu kompletních genů MYBPC3, MYH7, TNNT2 a TNNI3. Isolace DNA byla prováděna ze vzorků nesrážlivé krve za použití standardní „spin-column“ techniky. Většina vzorků byla procesována kity QIAQuick DNA (blood) mini kit ((Qiagen GmbH, Hilden, Německo), v případě opakovaně neúspěšné izolace byly použity kity JetQuick DNA Isolation (GENOMED GmbH, Loehne, Německo). PCE amplifikace byla prováděna kity QiaAmp (QiaGen), případně kity Taq-Purple PCR Master Mix (Top-bio, Praha). Sekvenování PCR amplifikovaných exonů bylo prováděno pomocí standardní Sangerovy di-deoxy-terminátorové technologie s použitím DYEnamic terminator sekvenačního kitu (GE Biosciences, Piscataway, NJ) a separace sekvenačních produktů pomocí vysokokapacitního 96-kapilárního sekvenátoru MegaBACE 1000 (GE Biosciences). K přečištění sekvenačních produktů byla použita technologie size-exkluze na matici Sephadex G-50 (GE Biosciences).

Pro navržení vhodných podmínek pro amplifikace byly jako předloha použity sekvence z databáze CardioGenomics - Sarcomere Protein Gene Mutation Database (<http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/>). Sekvenování probíhalo v několika fázích. Nejprve byly optimální podmínky amplifikace a sekvenační reakce otestovány na úvodní sadě 5 - 10 vzorcích. V případě vysoké kvality sekvencí (PHRED20 score) byly stejné podmínky použity na další vzorky. Pokud nebyly dosaženy kvalitní sekvence v úvodní sadě, proběhla nová optimalizace PCR podmínek a sekvenace. Po dokončení sekvenace

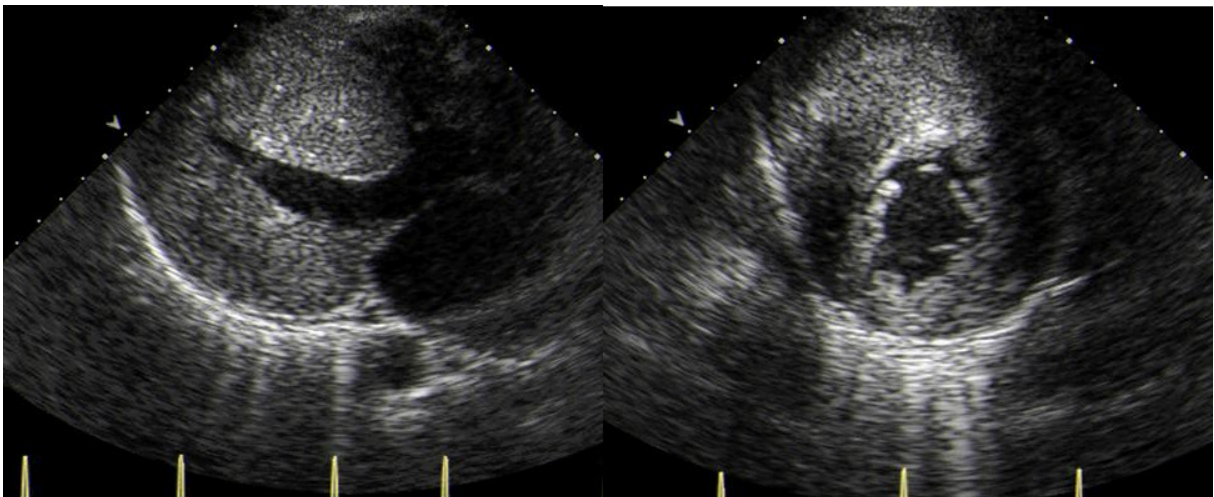
byly následně u každého genu provedeny opravy vzorků, u kterých náhodně selhala amplifikační nebo sekvenační reakce. Sekvenační data byla procesována v programu Sequencher (GeneCodes, Ann Arbor, MI).

### 3.3 Statistická analýza:

K statistické analýze byl použit program SPSS Statistics, verze 17.0. Numerická data jsou uvedeny jako průměr  $\pm$ SD. Kategorická data jsou prezentována jako čísla a procenta. K vyhodnocení dat byl použit párový a nepárový Studentův t-test, Fischerův exaktní test a chi-kvadrát test podle potřeby. Pro všechny testy byl za statisticky významný považován rozdíl při  $p < 0,05$ .

Obr. 1:

Obraz hypertrofické kardiomyopatie při echokardiografickém vyšetření v parasternální dlouhé a krátké ose levé komory.



## 4. Dosažené výsledky

### 4.1 Zastoupení mutací u nemocných s HKMP

Provedli jsme genetickou analýzu exonů a přilehlých intronových sekvencí u 4 nejčastějších genů odpovědných za HKMP u 100 postižených jedinců. Základní charakteristiku sledovaného souboru ukazuje tab. 1.

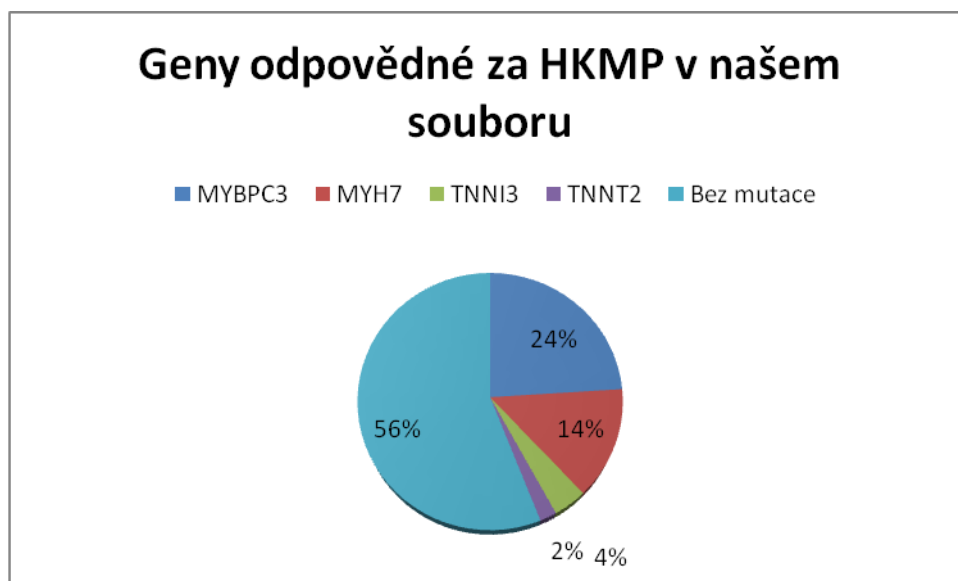
Tab 1: Charakteristika našeho souboru

	Sledovaný parameter
Věk, roky	53±15
Muži, n(%)	57 (57)
Ženy, n(%)	43 (43)
Patologické EKG, n(%)	100 (100)
NYHA I-II, n(%)	77 (77)
NYHA III-IV, n(%)	23 (23)
Synkopa v anamn., n(%)	25 (25)
Pacemaker, ICD, n(%)	15xPM, 8xICD (23)
LVEF, %	71±7
LVOTO, n(%)	18 (18)
MLVWT, mm	21±10
PTSMA, n(%)	27, (27)

Zkratky: PM - kardiostimulátor, ICD – kardioverter defibrilátor, LVEF – ejekční frakce levé komory srdeční, LVOTO – obstrukce ve výtokovém traktu levé komory srdeční, MLVWT – maximální tloušťka stěny levé komory srdeční, PTSMA – perkutánní transluminální alkoholová septální ablace

Výsledkem genetické analýzy byla detekce 44 mutací odpovědných za vznik HKMP u 40 osob. Celkově jsme našli 35 různých mutací, z nichž bylo 17 (49%) zjištěných de novo (dosud nebyly u pacientů s HKMP popsány). Mutace byly definovány jako kauzální, protože byly nalezeny u osob se specifickým fenotypovým obrazem a zároveň nebyly zjištěny u žádné ze 100 osob bez hypertrofie levé komory srdce v kontrolní skupině. U 4 osob bylo zjištěno postižení 2 různými mutacemi (2 x MYBPC3 + MYH7, 1 x MYBPC3 + TNNT2 a 1 x MYH7 + TNNT2). Nejčastějším genem odpovědným za HKMP v české populaci je MYBPC3 s 24% frekvencí výskytu, následovaný MYH7 s výskytem u 14% sledovaných jedinců a dále TNNT2 s 2% frekvencí výskytu (Obr. 2). Seznam všech zjištěných mutací přináší tabulka 2.

Obr 2:



Z 17 mutací nalezených v MYBPC3 bylo 13 mutací měnících smysl kodónu (missense), 3 nesmyslné (nonsense) mutace - E34 Gln1233X, E30 Gln1044X, E26 Lis811X, 1 delece - E3 del2330\_2351 a 3 abnormální sestřihy (2x E13 Thr343fs a 1x E7

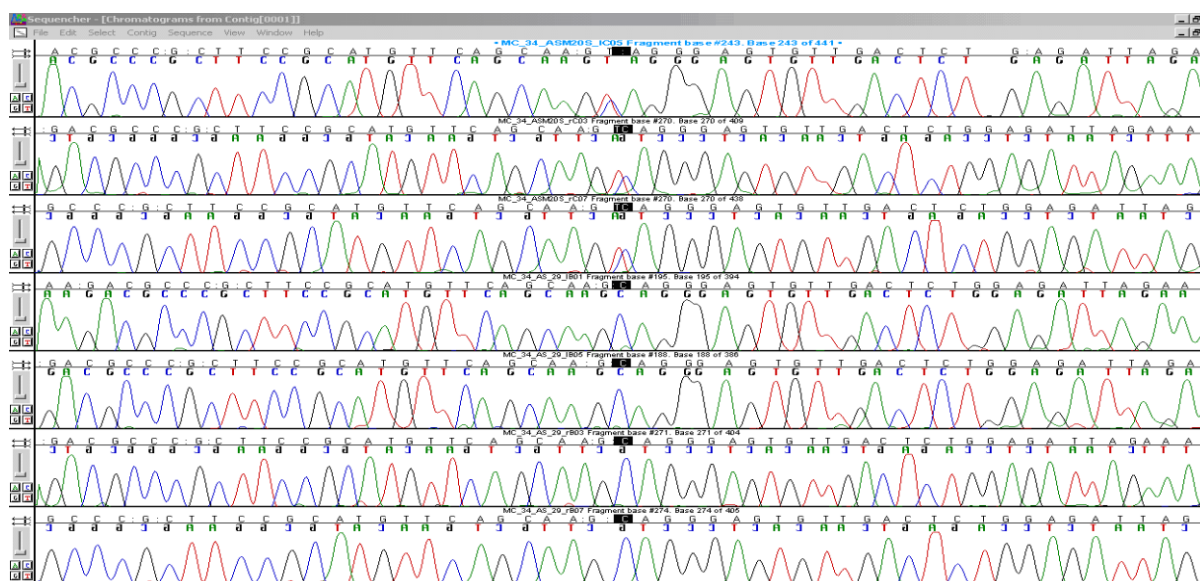
Ala232fs). V MYH7, TNNI3 a TNNT2 se jednalo vesměs o mutace měnící smysl kodonu (missense).

Tab 2: Mutace v jednotlivých genech dle exonů.

<b>MYBPC3</b>	<b>MYH7</b>	<b>TNNI3</b>	<b>TNNT2</b>
E3 del2330_2351	E5 Arg143Gln	E1 IVS1-39	E5 Ala28Val
E7 Ala232fs	E10 IVS10-17	E7 Arg141Gln celkem 2x	E16 IVS16-2
E7 Ser242Pro	E13 Arg403Gln celkem 2x	E7 Ala157Val	
E7 IVS7+1	E14 Ile467Leu		
E8 IVS8+1 celkem 5x	E15 Ans479Ser		
E13 Arg326Gln celkem 3x	E18 Thr660Asn		
E13 Glu334Lys	E19 IVS19+9		
E13 Thr343fs celkem 2x	E20 Ile736Thr		
E16 IVS16-13	E21 Asp778Val		
E18 Arg495Gln	E23 Glu924Lys		
E19 Arg597Gln	E23 Asp953His		
E25 IVS25-3	E23 Leu961Arg		
E26 Lis811X	E26 Gly1101Ser		
E30 Gln1044X			
E31 IVS31+5			
E32 IVS32+9			
E34 Gln1233X			

Nejčtenější mutací, vyskytující se v testovaném souboru, je intronová záměna v těsné blízkosti exonu 8 v MYBPC3 – celkově se vyskytuje u 5 pacientů, následována záměnou Arg326Gln ve 13. exonu MYBPC3 (celkem 3x). Dvakrát se vyskytují záměny Thr343fs v exonu 13 MYBPC3, Arg403Gln v 13. exonu MYH7 a Arg141Gln v 7. exonu TNNI3. Všechny ostatní mutace byly nalezeny v testovaném souboru pouze jednou. Na obr. 3 je uvedena ukázka detekce jedné z mutací.

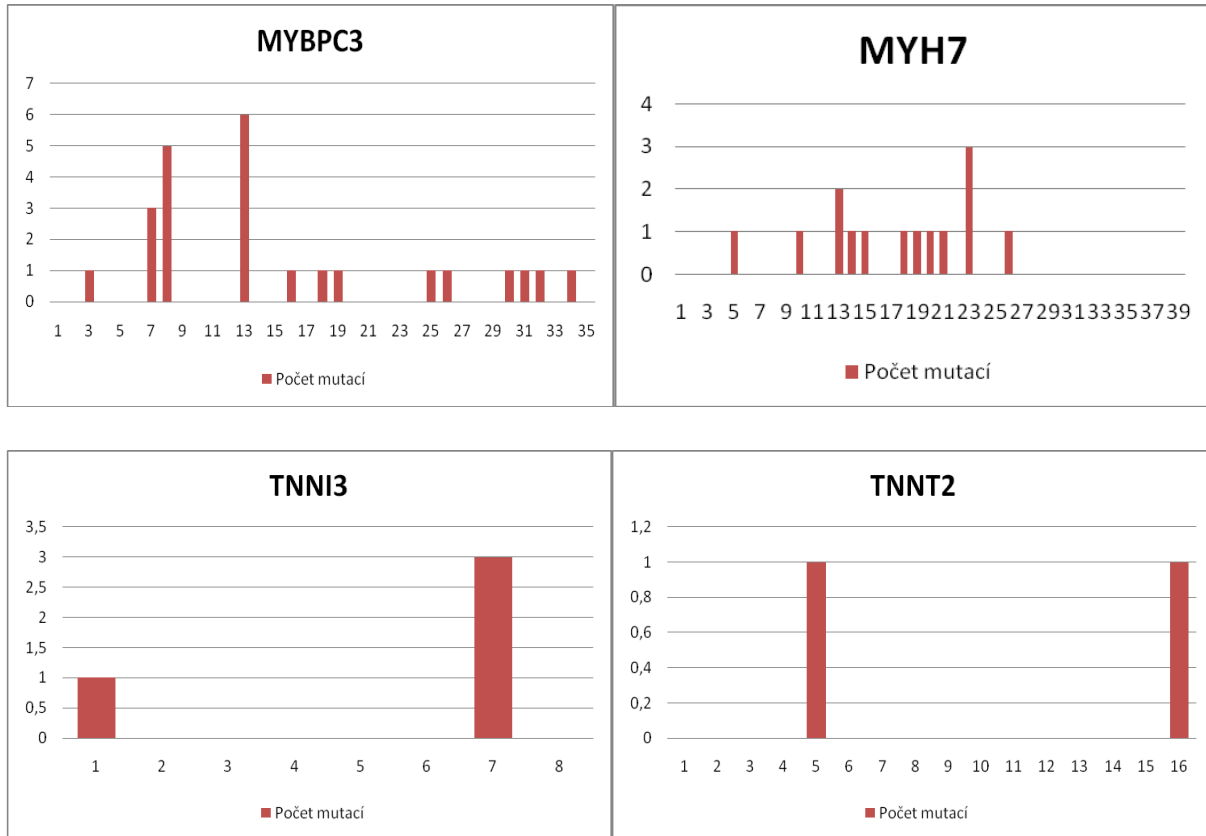
Obr 3: Ukázka detekce mutace Gln1233X v exonu 34 genu MYBPC3.



Z hlediska české populace se tedy jako nejčastěji zasažené jeví exony 7,8 a 13 u MYBPC3, exony 13, 23 u MYH7 a exon 7 u TNNI3 – graf 1.



Graf 1: Výskyt mutací ve zkoumaných genech dle exonů.



## 4.2. Genotyp - fenotypové koreláty u HKMP

### 4.2.1 Klinický obraz

Mezi skupinami pacientů rozdělených dle přítomnosti mutace jsme nenalezli žádný statisticky významný rozdíl v sledovaných klinických parametrech, jako je přítomnost dušnosti (dle klasifikace NYHA) či anginy pectoris (klasifikace CCS). Stejně tak nebyla zjištěna žádná statisticky významná odlišnost mezi jednotlivými skupinami ani ve výskytu palpitací, synkop, přítomnosti ICD, kardiostimulátoru či stavu po PTSMA (Tab 3).

Tab 3: Klinické projevy u sledovaných skupin nemocných.

<b>Gen</b>	<b>MYBPC3 (n=21)</b>	<b>MYH7 (n=11)</b>	<b>TNNI3 (n=3)</b>	<b>TNNT2 (n=1)</b>	<b>Dvojitá mutace (n=4)</b>	<b>Bez mutace (n=60)</b>	<b>p skupiny mezi sebou</b>
Věk, roky	45±13	45±16	52±13 let	50±0	65±13	56±14	0,026
Věk nástupu, roky	34±14	28±18	26±9 let	28±0	41±24	46±21	0,035
Dušnost dle NYHA	1,6±0,7	1,6±0,7	1,7±0,5	1±0 1	1,75±0,4	1,77±0,8	NS
Angina pectoris dle CCS	0,7±0,8	0,5±0,7	0,1±0,5	0±0	0,5±0,9	0,75±0,8	NS
Palpitace, n	6	4	1	1	1	17	NS
Synkopa, n	5	3	3	0	1	14	NS
ICD, n	3	0	2	0	1	3	NS
PM, n	6	2	0	0	1	6	NS
PTSMA, n	9	3	0	0	0	15	NS

#### 4.2.2 Echokardiografické parametry

Při porovnávání echokardiografických parametrů jednotlivých skupin nebyla kromě EF levé komory srdeční shledána v žádném parametru statistificky signifikantní odchylka. Z tab. 4 je však zřejmé, že pacienti s mutacemi ze skupiny troponinového

komplexu mají větší diastolický i systolický průměr levé komory srdeční.

Tab 4: Porovnání sledovaných echokardiografických parametrů.

<b>Gen</b>	<b>MYBPC3 (n=21)</b>	<b>MYH7 (n=11)</b>	<b>TNNI3 (n=3)</b>	<b>TNNT2 (n=1)</b>	<b>Dvojitá mutace (n=4)</b>	<b>Bez mutace (n=60)</b>	<b>p skupiny mezi sebou</b>
LVEDD, mm	43±4,4	44±6	50±4	54±0	46±6	45±5,3	NS
LVESD, mm	25±6	25±8	32±4	36±0	28±7	28±6	NS
EF, %	74±7	70±5	63±2	60±0	68±3	71±7	0,019
MiR, stupeň	0,9±0,7	1±0,9	2±0,7	1±0	1±0,4	1±1,0	NS
Obstrukce v LVOT, mmHg	21±24	21±26	5±0,5	2±0	8±4,6	22±31	NS
Max. hypertrofie, mm	20,7±4,1	21±3,6	20±0,8	15±0	16±0,8	21±4	NS
LA, mm	41±7	44±4	44±6	42±0	37±3	42±6	NS
Hmotnost LKS, g	315±120	342 ±132	318±43	271±0	221±65	343±167	NS

Zkratky: LVEDD – end-diastolický rozměr levé komory srdeční, LVESD – end-systolický rozměr levé komory srdeční, EF – ejekční frakce, MiR – mitrální regurgitace, LVOT – výtokový trakt levé komory srdeční, LA – levá síň

Pacienti ze skupin s mutacemi v TNNT2 a se 2 mutacemi mají sklon k menší max. tloušťce myokardu a také k nižší celkové hmotnosti levé komory - tento rozdíl nedosahuje statistické významnosti, mimo jiné i vzhledem k nízkému počtu jedinců v jednotlivých skupinách. Všechny 3 skupiny s vyšším počtem nemocných (MYBPC3, MYH7 a pacienti bez mutace) jsou překvapivě velice homogenní ve všech sledovaných parametrech. Když jsme porovnali výskyt mutací u pacientů po PTSMa (celkem 27 pacientů), 9 z nich mělo prokázanou mutaci v MYBPC3 a 3 pacienti měli mutaci v MYH7, opět bez signifikantního rozdílu při statistickém zpracování.

#### 4.2.3 Výskyt supraventrikulárních a komorových arytmií

Data získaná z klidového 12 - svodového EKG a 24 hodinové holterovské monitorace jsou shrnuta v tab. 5.

Tab 5: Nález na 12-svodovém EKG a při 24-hodinové EKG monitoraci.

<b>Gen</b>	<b>MYBPC3 (n=21)</b>	<b>MYH7 (n=11)</b>	<b>TNNI3 (n=3)</b>	<b>TNNT2 (n=1)</b>	<b>Dvojitá mutace (n=4)</b>	<b>Bez mutace (n=60)</b>	<b>p skup. mezi sebou</b>
Sinus, n	18	9	2	0	3	54	NS
Patol Q kmit, n	5	0	0	0	1	11	NS
Negat. T vlna, n	9	4	2	0	2	28	NS
iRBBB, n	1	2	0	1	1	4	0,018
RBBB, n	2	0	0	0	1	5	NS
LBBB, n	0	1	1	0	0	7	NS
SVT, n	1	2	1	1	1	7	NS
NsVT, n	1	1	0	0	0	2	NS
VT, n	1	0	0	0	0	3	NS
KF, n	0	0	0	0	0	0	NS

Zkratky: iRBBB – inkompletní blok pravého raménka Tawarova, RBBB – kompletní blok pravého raménka Tawarova, LBBB – kompletní blok levého raménka Tawarova, SVT – supraventrikulární tachykardie, NsVT – nesetrválá komorová tachykardie, VT – komorová tachykardie, KF – fibrilace komor.

Jediným nálezem, který byl signifikantně odlišný mezi jednotlivými skupinami, byla přítomnost iRBBB na EKG. V dalších sledovaných parametrech, jako je přítomnost jiného než sinusového rytmu, patologických kmitů Q, bloků Tawarových ramének či výskytu supraventrikulárních nebo komorových arytmii, nebyl prokázán signifikantní rozdíl. Je ale pravda, že výskyt jednotlivých událostí ve sledovaných genech je dost nízký a k přesnějšimu zhodnocení by byla vhodnější delší monitorace EKG nebo shromáždění údajů od větší skupiny nemocných.

#### 4.3 Vliv candesartanu na hypertrofii levé komory srdeční u pacientů s neobstruktivní formou HKMP

12 měsíční sledování ukončilo celkem 23 pacientů (1 pacient v placebové skupině stáhl svojí účast a nebyl do konečné analýzy zahrnut). Zjistili jsme, že v léčené skupině došlo v sledované době k statisticky významné regresi hypertrofie levé komory srdeční a její hmotnosti. Pacienti léčení candesartanem vykazovali lepší toleranci zátěže při ergometrickém vyšetření v porovnání s kontrolní skupinou; k zlepšení NYHA klasifikace minimálně o jeden stupeň došlo u 50% z nich, v kontrolní skupině se symptomy zlepšily pouze u 1 pacienta. Nedošlo k žádné změně hodnot systolického krevního tlaku či ejekční frakce LKS. Vliv candesartanu na uvedené charakteristiky po 12 měsíčním sledování je shrnut v tab. 6.

Tab 6: Symptomy, tolerance zátěže a echokardiografické parametry na začátku a konci 12-měsíčního sledování

	Candesartanová skupina (n=12)		Placebo skupina (n=11)		p skupiny pacientů mezi sebou
	začátek	12-měsíců	začátek	12-měsíců	
NYHA, n					
I	4	8	4	4	
II	4	4	4	5	0,07
III	4	0	3	2	
Systolický TK, mmHg	113	114	119	119	NS
Čas zátěže při ergometrii, s	574±151	751±161	629±149	603±162	0,049
Průměrná tloušťka myokardu, mm	20,0 ± 3,6	16,2±3,0	20,1±2,5	20,2±2,8	0,006
Ejekční frakce LKS, %	69±5	68±6	70±6	69±4	NS
Hmotnost LKS, g	407±139	344±102	451±228	449±232	0,04

Zajímavým nálezem bylo, že velikost regrese hmotnosti levé komory srdeční byla závislá i na mutaci specifického sarkomerického proteinu a největší regresi hypertrofie LKS jsme pozorovali při léčbě pacientů s mutací v MYH7 (Tab 7).

Tab 7: Změna v hmotnosti levé komory srdeční v aktivně léčené skupině při ukončení léčby v závislosti na výskytu mutace v jednotlivých genech.

<b>Změna hmotnosti LKS</b>		
	<b>g</b>	<b>%</b>
MYH7 (n=5)	-113	-23
MYBPC3 (n=3)	-47	-14
TnI (n=2)	0	0
Bez mutace (n=2)	-44	-15



## 5. Diskuze

I když dnes již víme, že dle postiženého genu nelze předpovědět prognózu pacienta, je genetické vyšetřování probandů a jejich rodinných příslušníků při již známém genotypu doporučováno (40). Spektrum mutací u HKMP je ale velice široké a většina z nich je privátní, což dělá genetické testování velice náročné z časových a finančních důvodů. Do doby, než budou k dispozici rychlejší a levnější metody genetického vyšetření, je racionální vyšetřovat geny (popř. exony) s nejvyšší frekvencí výskytu. Mutace v genech MYBPC3, MYH7, TNNT2 a TNNT3 jsou odpovědné za 90% případů HKMP se známým genotypem.

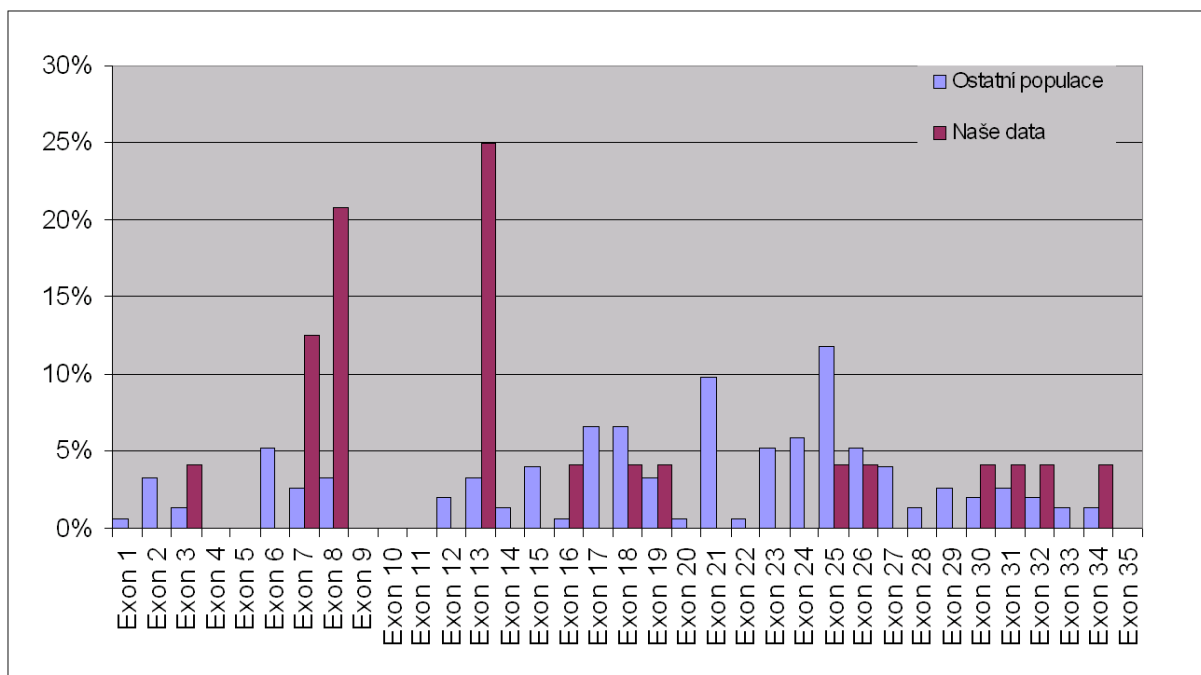
Při genetickém screeningu je užitečné postupovat od genu (popř. exonu) s vyšší frekvencí výskytu mutací s cílem co nejrychlejšího záchytu mutace, a tím i ušetření finančních prostředků. Je však známo, že zastoupení jednotlivých genů a jejich exonů se liší podle vyšetřované populace. V některých populacích (australská a čínská) je nejfrekventnějším genem MYH7 (31,41), zatímco jinde (španělská, německá, japonská a finská populace) je nejvíc mutací v genu MYBPC3 (42,43,44,45). V souborem francouzských a amerických autorů (46,47) byl poměr mutací v MYBPC3 a MYH7 přibližně stejný. Vzhledem k tomu, že nejčastějšími geny v české populaci jsou MYBPC3 a MYH7, doporučujeme započít s genetickým vyšetřením právě u nich. Rozložení mutací uvnitř jednotlivých genů ale není rovnoměrné. Jsou exony, ve kterých se vyskytuje mutace častěji a jsou přítomny také exony bez mutací.

Zajímavé je porovnání spektra mutací v MYBPC3 a MYH7 v našem souboru s ostatními populacemi. Námi nalezené mutační 'hot-spoty' v exonech 7,8 a 13 představují přes polovinu (58%) ze

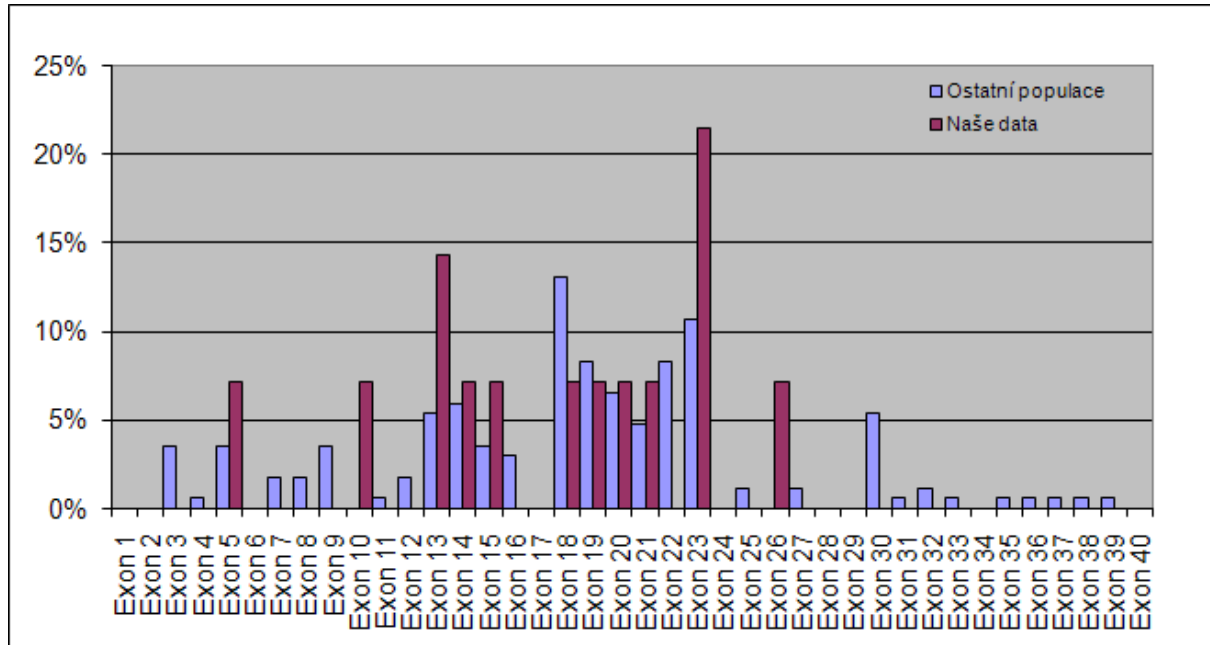
všech námi nalezených mutací v MYBPC3. V jiných populacích nejsou mutace v této lokalizaci až tak časté (přibližně 9% výskyt při shromáždění dat ze všech výše uvedených populací), jak ukazuje graf 2. Naopak v exonech 20 - 24 a 27 - 29, kde se u ostatních populací shromažďuje přibližně 30% mutací, jsme v našem souboru žádnou mutaci nezaznamenali.

Při zkoumání relativního zastoupení mutací v genu MYH7 (graf 3) jsou také zajímavé oba 'hot-spoty' v exonech 13 a 23, které jsou postiženy třikrát resp. dvakrát častěji než u ostatních populací (14% vs. 5%, resp. 22% vs. 11%). Současně nebyla nalezena žádná mutace v exonech 27-40 (14% zastoupení v ostatních populacích), které kódují nožičku bílkoviny myozínu.

Graf 2: Srovnání relativního zastoupení mutací v jednotlivých exonech genu MYBPC3 našeho souboru s ostatními populacemi.



Graf. 3: Srovnání relativního zastoupení mutací v jednotlivých exonech genu MYH7 našeho souboru s ostatními populacemi.

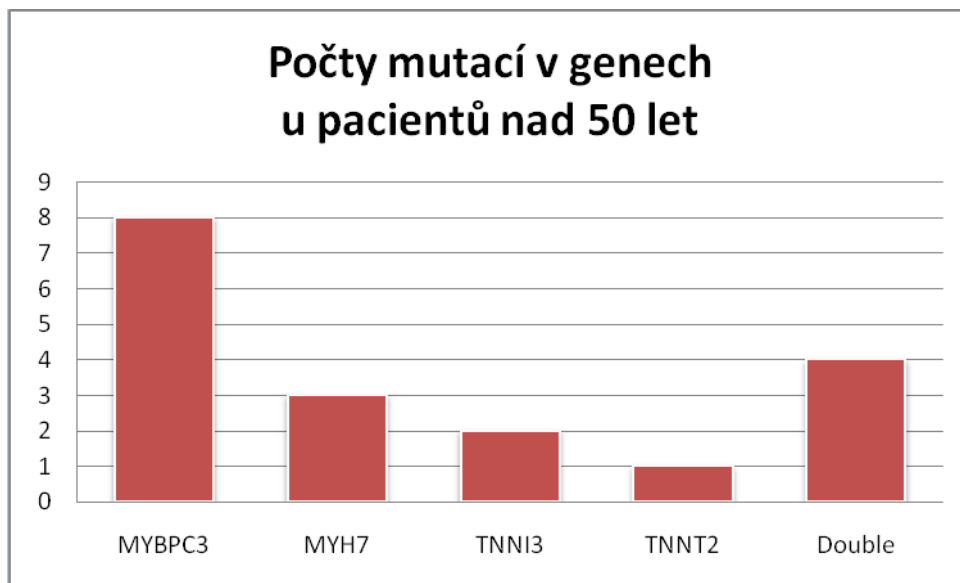


Z těchto výsledků se dá usuzovat, že zastoupení mutací uvnitř nejčastěji postižených genů je v české populaci poněkud odlišné od jiných populací. Proto při genetickém testování u českých nemocných s HKMP nemá význam postupovat od nejvíce postižených exonů dle zahraničních údajů.

Pacienti s HKMP jsou charakterističtí většinou nerovnoměrnou hypertrofií myokardu levé komory srdeční a širokým spektrem klinických příznaků. Pro nemoc je typické, že hypertrofie myokardu nebývá zpravidla přítomna již od narození, ale k jejímu rozvoji dochází v průběhu života. U některých forem HKMP (zejména pacienti postižení mutací v MYBPC3) se hypertrofie levé komory srdeční může rozvinout až ve vyšším věku - neúplná penetrance genotypu. V našem souboru pacientů byl průměrný věk nástupu choroby u nemocných s mutací v MYBPC3 nesignifikantně vyšší, než u pacientů s mutacemi v MYH7, TNNT3

a TNNT2, ale v porovnání s nemocnými s 2 mutacemi a bez mutace byl nižší (3 ze 4 nositelů dvojité mutace jsou ale postiženy i mutací v MYBPC3). V literatuře se také často udává, že mutace v MYBPC3 jsou nejčastěji odpovědné za HKMP u nemocných ve vyšším věku (48). V našem souboru průměrný věk pacientů s MYBPC3 patřil mezi nejnižší; nejvyšší věk měla skupina pacientů se 2 mutacemi. Na druhé straně, v skupině pacientů starších 50 let tvořili pacienti s mutací v MYPC3 44%, jak je patrné z grafu č. 4.

Graf 4: Zastoupení genů u pacientů nad 50 let.



Ze 100 zkoumaných jedinců jsme našli 4 pacienty s mutacemi v genech troponinového komplexu. Tři z nich mají mutaci v TNNI3 a 1 pacient je postižen mutací v TNNT2. Pacienti s mutací v TNNI3 mají výraznější hypertrofii LKS, častěji se u nich vyskytly synkopy a u 2 z nich byl implantován ICD. Pacient s mutací v TNNT2 má velice mírnou hypertrofii levé komory srdeční, je jen málo symptomatický a je jediným členem

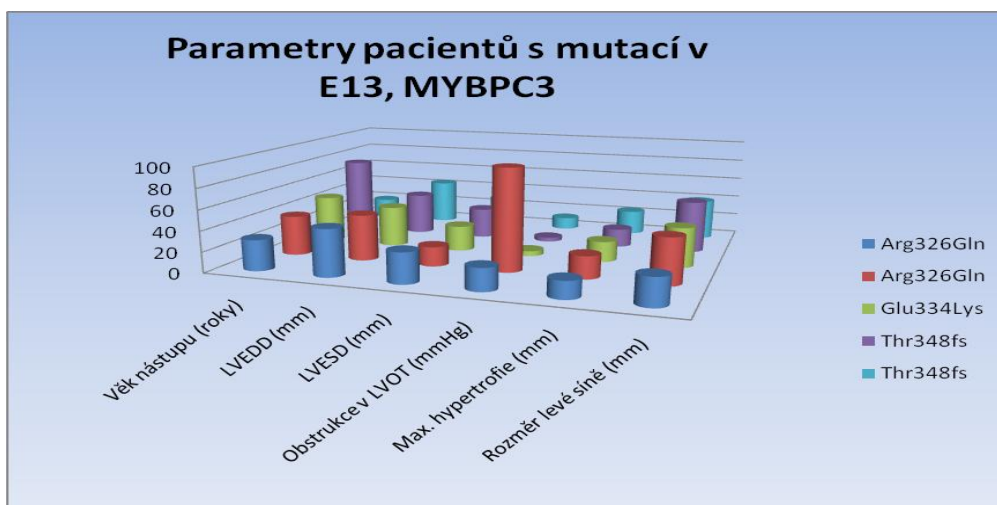
rodiny, u kterého se nemoc projevila. I když je v našem souboru počet nemocných s mutací v genech troponinového komplexu nízký, tyto naše dílčí výsledky rozšířily poznatky o jejich fenotypových projevech a jako první jsme zjistili reálné zastoupení mutací v genech troponinového komplexu u českých nemocných s HKMP.

Velice zajímavou skupinou jsou pacienti se současnými 2 mutacemi. Dle dosavadních poznatků je právě pro tuto skupinu charakteristické těžší postižení, závažnější klinické projevy a horší prognóza v porovnání s nemocnými s jednou mutací (33). Naši nemocní se 2 mutacemi mají ale nejvyšší průměrný věk; ze skupin s prokázanou mutací byly diagnostikovani nejpozději a v dalších klinických příznacích se nijak podstatně neliší od ostatních skupin. Navíc jak ukazují tabulky 3,4 a 5, tito jedinci mají jenom velice mírnou maximální tloušťku myokardu a celkovou hmotnost levé komory srdeční a nejsou u nich častější ani abnormality na EKG ani jakékoli poruchy rytmu. Dovolujeme si tedy tvrdit, že v našem souboru nemocných přítomnost 2 mutací neznamená pro probanda závažnější postižení ani prognózu v porovnání s jinými skupinami pacientů s HKMP.

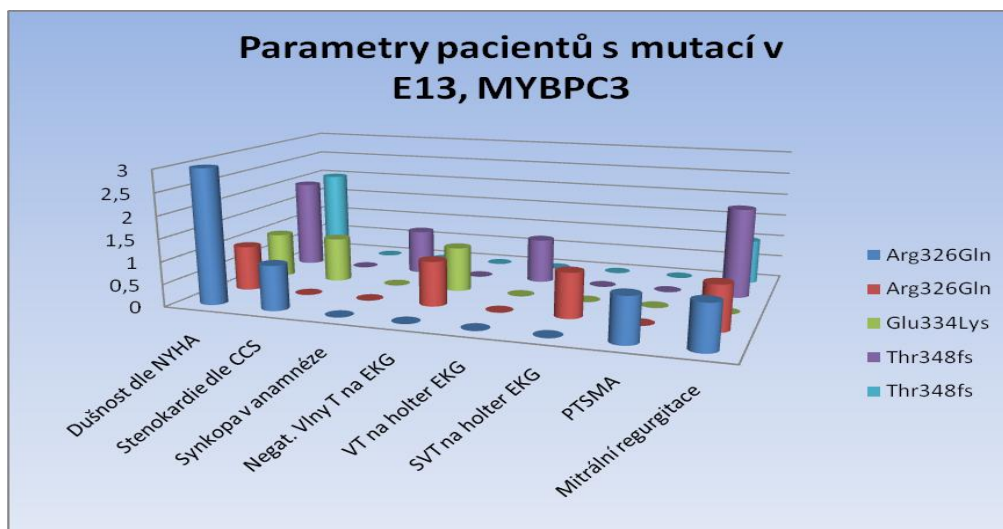
HKMP je tedy charakteristická širokou genotypovou a fenotypovou heterogenitou, přičemž ani identifikace mutovaného genu sama o sobě nestačí k určení rozsahu fenotypových projevů či určení další prognózy nositele mutace. Zaměřili jsme se proto podrobněji na fenotypové projevy v závislosti na změnách genetického materiálu na úrovni exonů či aminokyselin. Porovnali jsem fenotypové projevy u probandů s mutacemi v nejčastěji postiženém exonu v rámci naší studie; exonu 13 u MYBPC3. Jedná se o 4 jedince, všichni jsou muži věku od 34 do 77 let. I když se při postižení jednoho exonu dá očekávat postižení stejného funkčního místa bílkoviny, a tudíž by se měly projevit podobné fenotypové projevy, opak je pravdou. Jak

ukazují grafy 5 a 6, tito naši pacienti se mezi sebou liší ve většině klinických i echokardiografických parametrů. Vypočítaná hmotnost levé komory je rovněž velice rozdílná s hodnotami 313, vs. 506, vs. 231, vs. 203, vs. 358 g.

Graf 5. Srovnání věku nástupu a echokardiografických parametrů pacientů s mutací v exonu 13, genu MYBPC3.

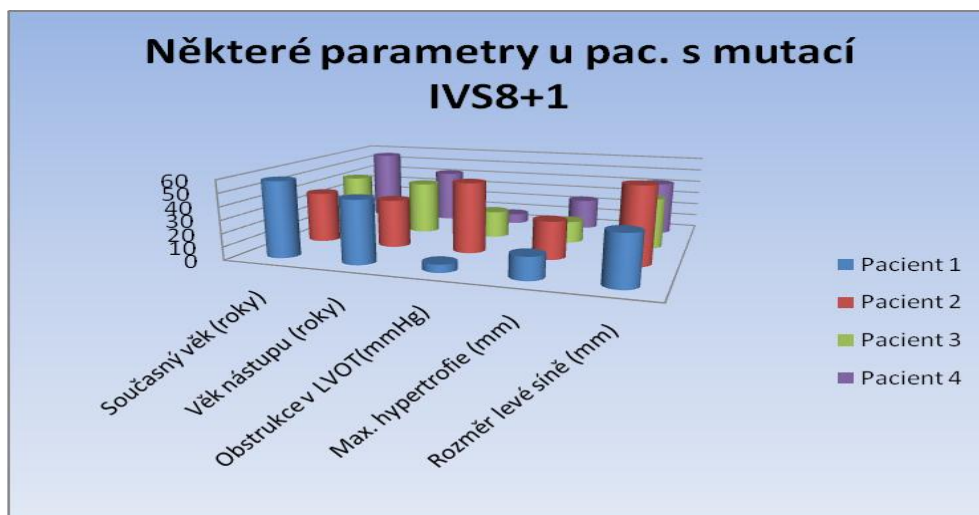


Graf 6. Srovnání klinických příznaků a stupně mitrální insuficience u pacientů s mutací v exonu 13, genu MYBPC3.

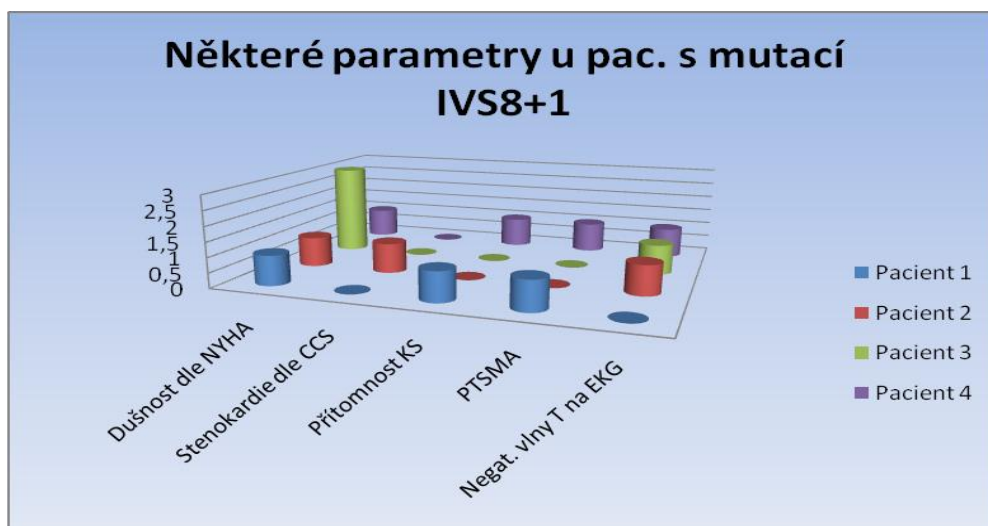


Navíc fenotypová manifestace není odlišná jenom u probandů s mutací v stejném exonu, je výrazně odlišná i u probandů, kteří jsou nositeli identické mutace. V naší skupině je nejčastější mutací intronová záměna v blízkosti 8. exonu genu MYBPC3 – tab 2; (pozn: 5. nositel této mutace má ještě druhou záměnu v MYH7). Jejich fenotypové projevy ukazují grafy 7 a 8, ze kterých je jasné že fenotypové projevy jsou velice odlišné i v této skupině.

Graf 7: Srovnání věku nástupu a echokardiografických parametrů pacientů s mutací IVS8+1 v MYBPC3.



Graf 8: Srovnání klinických příznaků a repolarizačních změn na EKG u pacientů s mutací IVS8+1 v MYBPC3.



Dále jsme u 2 našich pacientů zjistili přítomnost jedné mutace, která byla dle většiny dřívějších publikací považována za maligní. Jedná se o první mutaci, která byla v roce 1990 popsána u HKMP jako kauzální a je to mutace R403Q ve 13 exonu MYH7 (49). V rodině prvního pacienta byla přítomnost mutace skutečně spojená se zhoršenými fenotypovými projevy, jako je přechod do systolické dysfunkce LKS s nutností srdeční transplantace a snížené délky života. Nicméně u druhého nemocného, t.č. věku 77 let, nebyl zaznamenán výskyt komorových arytmií, přechod do systolické dysfunkce, ani zkrácení očekávané délky života.

Zdálo by se tedy, že podrobovat pacienty s HKMP genetickému vyšetření nemá žádný klinický přínos. Avšak dle práce italských autorů (50) mají pacienti s HKMP s prokázanou sarkomerickou mutací horší prognozu při dlouhodobém sledování. Tato horší prognoza je nezávislá na typu postiženého genu, resp. proteinu (tenká, intermediální nebo tlustá filamenta) a horší prognoza je důsledkem přechodu do systolické dysfunkce LKS a z toho vyplývající zvýšené kardiovaskulární mortality. Dále pak není pochyb o významu genetického testování u příbuzných probanda s již prokázanou mutací. Tam genetické vyšetření je stále jedinou metodou, která dokáže se 100% senzitivitou vyloučit možnost rozvoje fenotypu HKMP při negativním výsledku genetického vyšetření na specifickou mutaci. Jednou z dalších možností využití genetického vyšetření v současnosti je diferenciální diagnostika mezi HKMP a hypertrofií myokardu u tzv. 'atletického' srdce. Asi u 2% vrcholných sportovců mužského pohlaví se vyskytuje hypertrofie stěn levé komory v rozmezí 13-15 mm a asi třetina náhlých úmrtí u trénovaných atletů je způsobena HKMP. Právě průkaz mutace v některém z genů pro bílkoviny sarkomery srdečního svalu může pomoci rozlišit hypertrofii myokardu způsobenou intenzivním tréninkem od hypertrofie myokardu při HKMP.



Velikost hypertrofie LKS u pacientů s HKMP je považována za jeden z hlavních rizikových faktorů náhlé smrti (22). Dále je hypertrofie myokardu příčinou zhoršené diastolické funkce LKS s následnou poruchou plnění a z toho vyplývajícími symptomy, jako je zejména námahová dušnost. Patofyziologie vzniku hypertrofie myokardu u HKMP není úplně jasná. Mutace v genu sarkomerického proteinu patrně vede k inkorporaci defektního produktu do sarkomer kardiomyocytů. Výsledkem je sarkomera, která má zhoršenou funkci, což vede k snížení kontraktility myokardu. Toto je pravděpodobně stimulem k tvorbě celé řady růstových a profibrotických působků s následným rozvojem hypertrofie a fibrozy myokardu. Určitou úlohu zde určitě sehrává i tlakové zatížení myokardu. Na to nám poukazuje fakt, že i když je defektní protein bezpochyby přítomný i v sarkomerech myokardu pravé komory srdeční, hypertrofie u HKMP postihuje pravou komoru zcela vyjimečně. Stejně tak u pacientů po provedení alkoholové septální ablace pozorujeme mnohem větší úbytek hmotnosti myokardu (až 10x), než by odpovídalo hmotnosti nekrotické srdeční svaloviny (51). Je zcela nepochybné, že jedním z hlavních mediatorů odpovědných za rozvoj hypertrofie myokardu je angiotenzin II (AT II), působením zejména přes svůj receptor 1. typu (52). Blokádou tohoto receptoru pomocí candesartanu dochází k regresi velikosti hypertrofie myokardu a to nezávisle na hodnotách krevního tlaku, jak jsme potvrdili i v naší studii a uvádíme v tab. 6. Touto léčbou došlo nejenom k zmenšení hypertrofie LKS, ale i k příznivému ovlivnění symptomatologie a tolerance zátěže u pacientů s HKMP. Bohužel, vzhledem k nízkému počtu sledovaných pacientů s HKMP, se pravděpodobně nikdy nedočkáme velké randomizované studie, která by sledovala efekt určitého farmaka na jejich osud. A tak se naše poznatky i do budoucna budou zakládat na výsledcích malých randomizovaných či observačních studií.

## 5. Závěr

Provedli jsme genetické vyšetření u 100 jedinců s fenotypem HKMP. Při genetickém vyšetření jsme potvrdili přítomnost specifických mutací v 4 genech kódujících sarkomerické proteiny myofibríl buněk myokardu, které odpovídají za rozvoj onemocnění. Jako první jsme prokázali, že v české populaci je nejčtenějším genem odpovědným za vznik HKMP myozinový vazebný protein C (MYBPC3), nasledovaný genem pro těžký řetězec beta-myosinu (MYH7), troponinem I (TNNI3) a troponinem T (TNNT2), s frekvencí výskytu 24%, resp. 14%, 4% a 1%.

Relativní frekvence mutací ve dvou dominantních genech jsou v našem souboru poněkud odlišné oproti ostatním populacím. Hlavní mutační hotspoty, které by mohly být potenciálně vyjimečné pro naši populaci, se nacházejí v exonu 7,8 a 13 u MYBPC3 a v exonech 13 a 23 u MYH7.

Mezi jednotlivými skupinami pacientů s prokázanou mutací nebyl nalezen žádný signifikantní rozdíl v klinických nálezech, většině echokardiografických parametrů ani v EKG nálezu při 12-ti svodovém záznamu či holterovské monitoraci EKG. Nejistili jsme tedy korelaci mezi výskytem genově specifické mutace odpovědné za HKMP a specifickým klinickým obrazem charakteristickým pro mutaci daného genu či exonu.

V naší substudii vedlo podávání blokátoru AT-1 receptorů candesartanu k regresi hypertrofie LKS, zlepšení její funkce a zlepšení zátěžové tolerance u pacientů s neobstruktivní formou HKMP. Efekt léčby na velikost hypertrofie levé komory srdeční byl závislý i na typu genu, který byl mutací postižen.

Na základě výše uvedeného je tedy zřejmé, že fenotypové projevy u HKMP nejsou přímo závislé na postiženém genu či exonu a ani stejná mutace u různých jedinců není spojena s podobným fenotypovým projevem. Předpokládáme, že na výsledném fenotypovém obraze se podílí i jiné mutace, popř. polymorfismy v dalších oblastech lidského genomu, které teprve čekají na identifikaci. Míru fenotypové exprese a symptomy u nemocných postižených HKMP lze do určité míry ovlivnit pomocí dostupné léčby. Definitivní vyřešení této otázky by mohla přinést velká multicentrická randomizovaná studie přesahující hranice jednoho státu.

## 6. Literatura:

1. Gregor P, Widimský P, et al. Kardiologie. Galen. 1999;595:449-459.
2. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: A systematic review. JAMA. 2002;287:1308-1320
3. Niimura H, Bachinski LL, Sangwatanaroj S et al. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 1998;338:1248-1257.
4. Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and alpha-tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. N Engl J Med. 1995;332:1058-1064.
5. Maron BJ, Pelliccia A, Spirito P. Cardiac disease in young trained athletes. Insights into methods for distinguishing athlete's heart from structural heart disease, with particular emphasis on hypertrophic cardiomyopathy. Circulation. 1995;91:1596-1601.
6. McKenna W, Deanfield JE, Faruqui A, et al. Prognosis of hypertrophic cardiomyopathy: role of age and clinical, electrocardiographic and hemodynamic features. Am J Cardiol. 1981;47:532-538.
7. Maron BJ, Roberts WC, Epstein SE. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: profile of 78 patients. Circulation. 1982;65:1388-1394.
8. McKenna WJ, Camm AJ. Sudden death in hypertrophic cardiomyopathy: assessment of patients at high risk. Circulation. 1989;80:1489-1492.

9. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. *Circulation*. 1995;92:785-789.
10. Maron BJ, Spirito P, Roman MJ, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a population-based sample of American Indians aged 51 to 77 years (the Strong Heart Study), *Am J Cardiol*. 2004;93:1510-1514.
11. Maron BJ, Peterson EE, Maron MS, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in an outpatient population referred for echocardiographic study. *Am J Cardiol*. 1994;73:577-580.
12. Maron BJ, Olivotto I, Spirito P, et al. Epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy - related death: revisited in a large non-referral-based patient population. *Circulation*. 2000;102:858-864.
13. Maron BJ, Spirito P, Wesley Y, et al. Development and progression of left ventricular hypertrophy in children with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1986;315:610-14.
14. Niimura H, Bachinski LL, Bjornsdottir H. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1998; 338:1248-1257.
15. Gregor et al. Hypertrofická kardiomyopatie. Praha, *Scientia Medica* 1992;260:56-60.
16. Gregor P, Widimsky P, Cervenka V. Electrocardiographic changes can precede the development of myocardial hypertrophy in the setting of hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 1989;23:335-41.
17. Maron BJ, McKenna W, Danielson GK, et al. ACC/ESC clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus

Documents and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Committee to Develop an Expert Consensus Document on Hypertrophic Cardiomyopathy). *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1687-1713.

18. Maron MS, Olivotto I, Maron BJ. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003;348:295-303.
19. Maron MS, Olivotto I, Zenovich AG. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. *Circulation* 2006;114:2232-2239.
20. Veselka J, Linhart A, Šteiner I, et al. Hypertrofická kardiomyopatie a příbuzná témata. Galen. Praha, 2006;33-35.
21. Maron BJ. Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from athlete's heart: a clinical problem of increasing magnitude and significance. *Heart* 2005;91:1380-2.
22. Marian AJ. Contemporary treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Tex Heart Inst J*. 2009; 36: 194-204.
23. Maron BJ, Shen WK, Link MS, et al. Efficacy of implantable cardioverter-defibrillators for prevention of sudden death in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2000;342:365-73.
24. Frenneaux MP. Assessing the risk of sudden cardiac death in a patient with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart*. 2004;90:570-575.
25. Jarcho JA, McKenna W, Pare JA, et al. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med* 1989;321:1372-1378.

26. Rosenzweig A, Watkins H, Seidman CH, et al. Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med* 1991;325:1753-1760.
27. Solomon SD, Jarcho JA, McKenna W, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy is a genetically heterogeneous disease. *J Clin Invest* 1990;86:993-1000.
28. Alcalai R, Seidman JG, Seidman CHE. Genetic basis of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to the clinics. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2008;19:104-110.
29. Watkins H. Hypertrophic cardiomyopathy: from molecular and genetic mechanism to clinical management. *Eur Heart J Suppl* 2001;3:43-50.
30. Annan R, Greve G, Thierfelder L, et al. Prognostic implication of novel beta cardiac myosin heavy chain gene mutation that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* 1994;93:280-285.
31. Ackerman M, VanDriest S, Gersch J. Prevalence and age-dependence of malignant mutations in the beta-myosin heavy chain and troponin T genes in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:2042-2048.
32. Čurila K, Pěnička M, Línková H, Knot J, Gregor P. Molekulární genetika u hypertrofické kardiomyopatie. *Cor Vasa* 2007;49:138.142.
33. Woo A, Rakowski H, Sole MJ. Mutation of the beta-myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy: critical functional sites determine prognosis. *Heart* 2003; 89:1179-1185.
34. Ingles J, Doolan A, Seidman J, Semsarian Ch. Compound and double mutation in hypertrophic cardiomyopathy patients: implication for genetic testing and counselling. *Circulation* 2005;112:412.

35. Marian AJ, Yu QT, Workman R, Greve G, Roberts R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet* 1993;342:1085-1086.
36. Patel R, Lim DS, Reddy D, et al. Variants of trophic factors and expression of cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2369-2377.
37. Geisterfer-Lowrance AA, Christe M, Conner DA, Ingwall JS, Schoen FJ, Seidman CE, Seidman JG: A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science* 1996;272:731-734.
38. Tyska MJ, Hayes E, Giewat M, Seidman CE, Seidman JG, Warshaw DM: Single-molecule mechanics of R403Q cardiac myosin isolated from the mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res* 2000;86:737-744.
39. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989; 2:358-67.
40. Hershberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, et al. Genetic evaluation of cardiomyopathy - a Heart Failure Society of American Practice Guideline. *J Card Fail.* 2009;15:83-97.
41. Song L, Zou Y, Wang J, et al. Mutation profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clinica Chimica Acta* 2005;351:209-16.
42. Garcia-Castro M, Coto E, Reguero JR, et al. Mutation in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3 and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:48-56.



43. Erdmann J, Daehmlow S, Regitz-Zagrosek V, et al. Mutation spectrum in a large cohort of unrelated consecutive patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Genet* 2003;64:339-49.
44. Maeda K, Nakamura S, Murakami CH, et al. An analysis of three major sarcomeric genes (MYH7, TNNT2, MYBPC3) in cardiomyopathy. *Forensis Sci. Gene. Suppl.* 2009.
45. Jääskeläinen P, Kuusisto J, Miettinen R, et al. Mutations in the cardiac myosin-binding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med.* 2002;80:412-22.
46. Richard P, Charron P, Carrier L, et al. Hypertrophic cardiomyopathy. Distribution of disease genes, spectrum of mutations and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation* 2003;107:2227-2232.
47. Van Driest SL, Vasile VC, Ommen SR, et al. Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1903-10.
48. Niimura H, Patton KK, McKenna WJ, Soultis J, Maron BJ, Seidman JG, et al. Sarcomere protein gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. *Circulation* 2002; 105: 446 - 451.
49. Geisterfer-Lowrance AA, Kass S, Tanigawa G, Vosberg HP, McKenna W, Seidman CE, Seidman JG. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* 1990;62:999-1006.
50. Olivoto I, Girolami F, Ackerman MJ, et al. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 2008;83:630-638.

51. Mazur W, Nagueh SF, Lakkis NM, et al. Regression of left ventricular hypertrophy after nonsurgical septal reduction therapy, *Circulation* 2001; 103:1492-1496.
52. Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993;73:413-423.

7. Seznam publikací vztahujících se k náplni PGS studia:

1. Curila K, Benesova L, Penicka M, Minarik M, Zemanek D, Veselka J, Widimsky P, Gregor P. Spectrum and clinical manifestations of mutations in genes responsible for hypertrophic cardiomyopathy. Acta Cardiol. In Press. **IF 0,6**
2. Curila K, Benesova L, Penicka M, Minarik M, Zemanek D, Veselka J, Widimsky P and Gregor P. Low prevalence and variable clinical presentation of Troponin I and Troponin T genes mutations in hypertrophic cardiomyopathy. Genetic testing and molecular biomarkers. October 2009, 13: 647-650. **IF 0,9**
3. Penicka M, Gregor P, Kerekes R, Marek D, Curila K, Krupicka J. The effects of candesartan on left ventricular hypertrophy and function in nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. J Mol Diagn. 2009;11:35-41. **IF 4,2**
4. Čurila K, Pěnička M, Línková H, Knot J, Gregor G. Molekulární genetika u hypertrofické kardiomyopatie. Cor Vasa 2007;49(4):138-142.
5. Čurila K, Pěnička M, Minárik M, Línková H, Benešová L, Gregor P. Naše první zkušenosti s genetickým vyšetřením pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií: mutace genů pro troponin T a troponin I. Cor Vasa. 2008; 242-245
6. Čurila K, Gregor P. Latentní obstrukce ve výtokovém traktu levé komory srdeční u pacienta s hypertrofickou kardiomyopatií. Kardiolog rev 2011; 13(1): 63-64.