Naše první zkušenosti s genetickým vyšetřením pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií: mutace genů pro troponin T a troponin I*

Karol Čurila, Martin Pěnička, Marek Minárik*, Hana Línková,
Lucie Benešová*, Pavel Gregor

III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta
Univerzity Karlovy, *Laboratoř molekulární genetiky Genomac International, s. r. o., Praha, Česká republika

Čurila K, Pěnička M, Minárik M*, Línková H, Benešová L*, Gregor P (III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, *Laboratoř molekulární genetiky Genomac International, s. r. o., Praha, Česká republika). **Naše první zkušenosti s genetickým vyšetřením pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií: mutace genů pro troponin T a troponin I.** *Cor Vasa* 2008;50(6):242–245.

Úvod: Hypertrofická kardiomyopatie (HKMP) je autosomálně dominantně dědičné onemocnění způsobené mutacemi v genech kódujících sarkomerické proteiny srdečního svalu. Troponin T (TNNT2) a Troponin I (TNNI3) jsou důležitou součástí sarkomery myokardu a mutace v jejich genech jsou odpovědné za rozvoj HKMP u postižených jedinců. Frekvence výskytu mutací v těchto dvou genech je udávána v rozmezí 3–15 %.

Metody: Zkoumali jsme prevalenci mutací v genech pro troponin T a troponin I u 40 pacientů s HKMP, sledovaných v Kardiocentru FNKV. Vzorů DNA pacientů byly podrobeny genetickému vyšetření pomocí obousměrné sekvenace PCR-produktů. Testovány byly exony 8–11, 14–16 u TNNT2 a exony 5, 7, 8 u TNNI3.

Výsledek: Nemoc způsobující mutace byla nalezena u 3 (7,5 %) pacientů. Všechny mutace byly nalezeny v genu pro troponin I, a to v exonu 7 (2 × Arg141Gln a jednou Ala157Val). Další genetické vyšetření v rodinách postižených jedinců odhalilo celkově 4 další nositele mutace. Probandi byli charakterizováni mírnou symptomatologií při středně velké hypertrofii myokardu (průměrná max. tloušťka myokardu byla 23 ± 3 mm). V rodině s mutací Ala157Val byl pozorován vyšší výskyt náhlé smrti, a to jak v mladém tak i ve vyšším věku.

Závěr: V našem souboru nemocných s HKMP jsme pozorovali vyšší frekvenci (7,5 %) výskytu mutací v genu pro troponin I a žádné mutace v genu pro troponin T. Genotypově pozitivní jedinci byli charakterizováni poměrně chudou symptomatologií, avšak v rodině postižené mutací Ala157Val byl pozorován vyšší riziko náhlé smrti.

Klíčová slova: Hypertrofická kardiomyopatie – Geny – Mutace – Troponin I – Troponin T

Čurila K, Pěnička M, Minárik M*, Línková H, Benešová L*, Gregor P (Department of Internal Medicine III, Heart Center, Královské Vinohrady University Hospital and Charles University School of Medicine 3, *Genomac International, Molecular Genetics Laboratory, Inc., Prague, Czech Republic). **Our initial experience with genetic testing of patients with hypertrophic cardiomyopathy: mutations of troponin T and troponin I genes.** *Cor Vasa* 2008;50(6):242–245.

Introduction: Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is an autosomal hereditary dominant disorder caused by mutations in genes encoding cardiac sarcomeric proteins. Troponin T and troponin I make an important part of the heart muscle sarcomere and mutations in their genes are responsible for developing HCM. The frequency of these 2 genes is reported to be about 3–15%.

Method: We studied the prevalence of mutations in troponin T and troponin I genes in 40 individuals with HCM on follow-up in the Heart Center of a Prague-based hospital. DNA samples were genetically tested using direct bidirectional sequencing of PCR products. Genetic testing was performed in exons 8–11 and 14–16 in TNNT2 and exons 5, 7, and 8 in TNNI3.

Results: The disease causing mutation was found in 3 (7.5%) patients. All mutations were present only in the troponin I gene, in exon 7 (2 × Arg141Gln and 1 × Ala157Val). Further genetic testing identified a total of another 4 mutation carriers in the affected families. The subjects were characterized by mild symptoms and moderate left ventricular hypertrophy (mean maximum septal wall thickness 23 ± 3 mm). An increased incidence of sudden cardiac death, both in young and adult age, was observed in a family with the Ala157Val mutation.

Conclusion: We observed a higher incidence (7.5%) of troponin I gene mutations and no mutation in the troponin T gene in our group of HCM patients. While patients with mutations were characterized by mild symptoms, an increased risk for sudden death was noted in the family with the Ala157Val mutation.

Key words: Hypertrophic cardiomyopathy – Genes – Mutations – Troponin I – Troponin T

Adresa: MUDr. Karol Čurila, III. interní-kardiologická klinika, FNKV a 3. LF UK, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Česká republika, e-mail: curilakarol@seznam.cz

*Práce byla podpořena grantem České kardiologické společnosti.

ÚVOD

Hypertrofická kardiomyopatie (HKMP) je onemocnění, které je charakteristické zbytněním myokardu septa a/nebo levé komory, poruchou diastolického plnění a v některých případech i systolickou obstrukcí ve výtokovém traktu levé, popřípadě i pravé komory.⁽¹⁾ Vyskytuje se u 0,2 % dospělé populace.⁽²⁾

Příčinou onemocnění je mutace v genech kódujících bílkoviny sarkomery srdečního svalu. V současnosti je popsáno více než 400 mutací na minimálně deseti genech.^(3,7) Většina mutací byla nalezena v genu pro těžký řetězec beta-myozinu (MYH7) a genu pro myozin vazební protein C (MYBPC3). Fenotypový projev těchto mutací je vzhledem k jejich hojnému zastoupení dobře známý. Kromě těchto nejčastěji se vyskytujících genů je velká pozornost věnována i skupině genů tzv. troponinového komplexu. Nejvýznamnější z této skupiny je izoforma troponinu T2 (TNNT2) a izoforma troponinu I3 (TNNI3). Přestože podíl mutací v genech troponinového komplexu na výskytu HKMP je v porovnání s MYH7 a MYBPC3 nižší, 3–15 %, ^(4–6) právě mutace v genu pro TNNT2 mohou způsobit náhlou smrt i při minimální hypertrofii myokardu.⁽⁵⁾ Naše současné literární znalosti o fenotypovém projevu mutací v TNNI3 jsou vzhledem k jejich nízké frekvenci výskytu skromné.⁽⁶⁾

CÍL STUDIE

Zjistit frekvenci výskytu mutací v genech pro troponin I a troponin T u českých pacientů s HKMP a zároveň sledovat klinické projevy u genotypově pozitivních nemocných.

MATERIÁL A METODY

Do studie bylo zařazeno 40 pacientů s HKMP, kteří jsou v dlouhodobém sledování v Kardiocentru FNKV. U všech bylo provedeno EKG, podrobné fyzikální, klinické a echokardiografické vyšetření. Jako pacienti s HKMP byli označeni ti nemocní, jež mají hypertrofii levé komory srdeční větší než 15 mm u mužů a 13 mm u žen, bez jiného onemocnění, které by tuto hypertrofii mohlo způsobit (např. hypertenze, aortální stenóza). Další podmínkou zařazení byla přítomnost patologického EKG a podepsání informovaného souhlasu, který byl schválen Etickou komisí FNKV. U všech jedinců bylo pak odebráno 10 ml krve, která byla odeslána ke genetickému vyšetření. Všichni rodinní příslušníci postižených jedinců byli geneticky vyšetřeni a ti z nich, u kterých byla prokázána mutace, se následně podrobili klinickému vyšetření.

Echokardiografické vyšetření bylo provedeno ze standardních parasternálních a apikálních projekcí. Rozměry levé komory a levé síně byly změřeny z M-modu v parasternální projekci na dlouhou osu.⁽⁸⁾ Ejekční frakce levé komory byla počítána biapikální Simpsonovou metodou z apikální čtyř- a dvoudutinové projekce.⁽⁸⁾ Vrcholový tlakový gradient ve výtokovém traktu levé komory by odvozen pomocí Bernoulliho rovnice, $P = 4V^2$, kde P představuje tlakový gradient a V je rychlost určená dopplerovskou echokardiografií. Významná obstrukce byla definována nálezem klidového gradientu ve výtokové traktu levé komory

≥ 30 mm Hg.⁽⁹⁾ Enddiastolická tloušťka stěny byla hodnocena ve všech segmentech levé komory (16segmentový model) v parasternální projekci na krátkou osu. U každého pacienta byla stanovena maximální tloušťka myokardu stěny levé komory. Vypočítána byla střední tloušťka myokardu (aritmetický průměr tloušťek myokardu měřených v každém z uvedených segmentů levé komory) a rozsah hypertrofie; tzn. počet segmentů s hypertrofií násobený číslem 16. Průměrná hodnota každého parametru byla vypočítána ze 3–5 následných srdečních cyklů. Všechna echokardiografická vyšetření a jejich analýzy byly prováděny zkušeným echokardiografistou při neznalosti údajů z klinického sledování pacientů.

Genetické vyšetření: Izolace DNA z krevních vzorků byla prováděna standardní metodou extrakce na kolonkách za použití komerčního kitu QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen, GmbH, Hilden, Německo). Zárodečné mutace v genech TNNT2 a TNNI3 byly vyšetřovány s použitím obousměrného sekvenování PCR amplikonů za použití primerů navržených podle informací získaných z databáze univerzity v Harvardu.⁽³⁾ Sekvenace Sangerovou metodou se značenými di-deoxy-terminátory byly prováděny s použitím kitů DYEnamic (TM) ET terminator sequencing kit (GE Healthcare, Piscataway, USA). Analýza sekvenačních produktů byla prováděna na 96kapilárním genetickém analyzátoru MegaBACE 1000 (GE Biosciences, Piscataway, New York, USA) vybaveném robotickým podavačem vzorků Caddy 1000 (Watrex Praha, Česká republika) pro automatický provoz bez obsluhy. Sekvence byly vyhodnoceny s použitím Sequence Analyzer 3.0 Software (GE Biosciences) a pro vyhodnocení mutací byl použit software Sequencher 3.0 (Gene Codes, Ann Arbor, USA).

Statistická analýza: Všechny hodnoty jsou uvedeny jako průměr $\pm$ standardní odchylka.

VÝSLEDKY

40 nepříbuzných jedinců s HKMP bylo vyšetřeno na přítomnost mutací v genu pro troponin T a troponin I. Jednalo se o pacienty dlouhodobě sledované v Kardiocentru FNKV pro HKMP.

Bližší charakteristiku souboru uvádíme v *tabulce I*. Onemocnění způsobující mutace byla nalezena u 3 (7,5 %) pacientů – všechny byly lokalizovány v 7. exonu genu pro troponin I. Jednalo se o známé mutace způsobující HKMP⁽³⁾ – 2× Arg141Gln a jednou Ala157Val. Následné genetické vyšetření u příbuzných probandů odhalilo další 4 jedince s výše uvedenými mutacemi. V *tabulce II* uvádíme základní charakteristiku genotypově pozitivních pacientů.

Dospělí genotypově pozitivní žijící pacienti s HKMP mají výraznější hypertrofii myokardu levé komory – průměrnou maximální tloušťku myokardu 22 ± 3 mm, normální ejekční frakci 67 ± 6 % a nepřítomnost klidové obstrukce ve výtokovém traktu levé komory srdeční. Probandi jsou klinicky asymptomaticí, holterovské monitorování EKG a zátěžové vyšetření na bicyklovém ergometru byly provedeny s normálním nálezem. Mezi těmi, kteří byli geneticky vyšetřeni, jsou i jedinci mladší 15 let v rodinách A a B. Oba jsou

Tabulka I
Soubor nemocných s HKMP, u kterých bylo provedeno genetické testování

Sledovaná kategorie	Hodnota
Průměrný věk	48 ± 15 let
Muži	23 (57 %)
Ženy	17 (43 %)
Familiární forma	27 (67 %)
Patologické EKG	40 (100 %)
NYHA I–II	32 (80 %)
NYHA III–IV	8 (20 %)
Synkopa v anamnéze	12 (30 %)
Přítomnost PM, ICD	5× PM, 5× ICD (25 %)
EF LKS	67 ± 6 %
LVOTO	7 (18 %)
Průměrná maximální tloušťka myokardu	20 ± 4 mm
Průměrná střední tloušťka myokardu	106 ± 52
Průměrný rozsah hypertrofie	14 ± 2

PM – kardiostimulátor, ICD – kardioverter-defibrilátor, EF LKS – ejekční frakce levé komory srdeční, LVOTO – přítomnost obstrukce ve výtokovém traktu levé komory

asymptomatických, mají normální nález EKG a jsou bez známek hypertrofie myokardu při echokardiografickém vyšetření. Náhlá smrt byla pozorována ve dvou rodinách. V rodině B se u nemocného srdeční zástava manifestovala synkopou ve vyšším věku a na základě dokumentované setrvalé komorové tachykardie byl pacientovi implantován kardioverter-defibrilátor. V rodině C byl výskyt náhle smrti dokumentován u dvou jedinců jak v mladém, tak i ve vyšším věku. Kompletní rodokmeny postižených rodin uvádíme na *obrázku 1*.

DISKUSE

V této studii jsme zkoumali výskyt mutací v genech pro troponin T a troponin I a jejich klinické projevy u pacientů s hypertrofickou kardiomyopatií. V naší zkoumané populaci byly zjištěny mutace v genu pro troponin I u 7,5 % nemocných. U žádného z pacientů nebyla prokázána mutace v genu pro troponin T. V počátcích genetického testování byl troponin T považován za poměrně frekventní gen odpovědný za

Tabulka II
Charakteristika postižených jedinců

Rodina	Jedinec	Pohlaví	Věk	EKG	EF (%)	Maximální tloušťka myokardu	Symptomy
Rodina A	II: 2	M	33	negativní T V4–V6	65	19 mm	0
	III: 2	M	5	normální	65	normální	0
Rodina B	I: 1	M	67	FiS	65	20 mm	NYHA II ICD pro sVT
	II: 2	M	42	FiS, LVH	75	22 mm	0
Rodina C	III: 1	M	9	normální	65	normální	0
	II: 2	Ž	54	patologické Q	60	21 mm	NYHA II
	III: 1	M	33	patologické Q RVH	70	27 mm	0

M – muž, Ž – žena, FiS – fibrilace síní, LVH – hypertrofie levé komory, RVH – hypertrofie pravé komory, sVT – setrvalá komorová tachykardie, ICD – kardioverter-defibrilátor

Obr. 1

Na obrázku vidíme, že u rodiny C je vyšší riziko náhlého úmrtí – vyskytlo se u 50 % postižených jedinců; u nemocné I: 2 ve věku 51 let, stejně tak u pacientky III: 2 v 16 letech. V rodině B měl pacient I: 1 synkopy s následnou dokumentovanou setrvalou komorovou tachykardií ve věku 66 let. Šipkou jsou označeni probandi. Znaménkem + jsou označeni pacienti, kteří podstoupili genetické vyšetření.

rozvoj HKMP,⁽⁵⁾ přičemž troponinu I se přisuzoval minoritní význam. Do dnešního dne bylo celosvětově identifikováno 27 mutací v genu pro troponin I a 31 mutací v genu pro troponin T odpovědných za vznik HKMP.⁽³⁾ Ukazuje se však, že frekvence výskytu obou genů je porovnatelně nízká.^(4,6,7,10) Naše výsledky naznačují, že frekvence výskytu mutací v genu pro troponin I je v české populaci větší než výskyt mutací v troponinu T. Tento výsledek naší práce však může být ovlivněn velikostí zkoumaného souboru. Dalším faktorem, který se mohl podílet na nižší frekvenci mutací v genu pro troponin T, jsou kritéria stupně hypertrofie myokardu. Do našeho souboru pacientů byli zařazeni jedinci s hypertrofií nad 15 mm u mužů a 13 mm u žen, přičemž právě nositelé mutace v genu pro troponin T mají často hraniční velikost hypertrofie myokardu.⁽⁵⁾ Námi zvolená velikost hypertrofie myokardu je však často doporučovaná jako kritérium stanovení diagnózy HKMP^(10,11) a současně jsme se chtěli vyhnout zařazení pacientů s hraniční hypertrofií myokardu z jiné příčiny.

Echokardiografický obraz geneticky identifikovaných dospělých jedinců v našem souboru je charakteristický výraznější hypertrofií myokardu levé komory, bez klidové obstrukce ve výtokovém traktu LKS. Klinické projevy nemocných s prokázanou mutací byly různorodé. Kromě výskytu náhlé smrti zpravidla souvisely s věkem postiženého pacienta. Všichni probandi (muži středního věku) byli asymptomatictí, stejně tak jako jejich potomci. Symptomatictí byli jedinci ve vyšším věku, u dvou z nich se vyskytlo náhlé úmrtí. Pokud jde o riziko náhlé smrti – jako malignější je zdá mutace Ala157Val, kde v rodině C byl výskyt náhlého úmrtí u 50 % postižených jedinců (obrázek 1). Podobně špatná prognóza u mutace Ala157Val byla pozorovaná v práci Brita a spol.,⁽¹²⁾ podobně Mogensen a spol. pozorovali náhlé úmrtí u jednoho z 5 nositelů této mutace.⁽⁶⁾ Dosavadní poznatky o klinickém obrazu pacientů s mutací Arg141Gln jsou skromné (2 případy), nicméně ani v jednom z nich nebylo zaznamenáno náhlé úmrtí.^(6,7)

LITERATURA

- Gregor P, Widimský P, Anděl M, et al. Kardiologie. Praha: Galén, 1999:595,449.

- Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adult: echokardiographic analysis of 4111 subject in KARDIA study. *Circulation* 1995;92:785–9.
- <http://genetics.med.harvard.edu/~seidman/cg3/index.html>
- 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;107:2227–32.
- Watkins H, McKenna WJ, Thierfelder L, et al. Mutations in the genes for cardiac troponin T and – tropomyosin in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1995; 332:1058–64.
- Mogensen J, Murphy RT, Kubo T, et al. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:2315–25.
- Van Driest SL, Ellsworth EG, Ommen SR, et al. Prevalence and spectrum of thin filament mutations in an outpatient referral population with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation* 2003;108:445–51.
- 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.
- Maron MS, Olivetto I, Betocchi S, et al. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 2003; 348:295–303.
- McKenna WJ, Sharma S and Elliot PM. Management strategies in hypertrophic cardiomyopathy: influence of age and morphology. *Eur Heart* 2001;3 (Suppl L): L10–L14.
- Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, et al. ACC/ESC clinical expert consensus document on hypertrophic cardiomyopathy: a 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: 1965–91.
- Brito D, Madeira H. Malignant mutations in hypertrophic cardiomyopathy: fact or fancy? *Rev Port Cardiol* 2005; 24:1137–46.

Došlo do redakce 12. 3. 2008

Přijato po úpravách 21. 4. 2008