



FN MOTOL



MASIVNÍ PARALELNÍ SEKVENOVÁNÍ U MLADÝCH OBĚTÍ NÁHLÉ SRDEČNÍ SMRTI V ČR

Votýpka P.¹, Peldová P.¹, Krebsová A.², Rücklová K.¹⁰, Pilin A.⁴, Kučerová-Pohlová Š.⁹, Petřková J.⁸, Blanková A.³, Kulvajtová M.⁶, Tavačová T.⁷, Tomášek P.⁵, Janoušek J.⁷, Macek M. Jr.¹,

Úvod

Náhlá srdeční smrt (SCD) je u mladých osob poměrně vzácným jevem. Podle dostupných statistik připadají 1-2 případy náhlého úmrtí osob do 40 let věku na 100 tisíc obyvatel/rok. Nebezpečí však spočívá v tom, že srdeční zástava může být prvním symptomem, kterým se srdeční onemocnění projevuje. Příčiny SCD jsou různé a předpokládá se, že zhruba v 60 % z nich je příčinou vrozené onemocnění srdce. Navíc se ve většině případů jedná o autozomálně dominantní přenos, je proto velké riziko opakování náhlého úmrtí v rodině. Nalezení kauzální varianty tak může mít zásadní vliv na preventivní opatření u dalších členů postižené rodiny. Vrozené příčiny SCD můžeme rozdělit do čtyř skupin – kardiomyopatie, primární poruchy elektrické vodivosti, vrozená onemocnění koronárních tepen a vrozené vývojové vady srdce.

Kardiomyopatie tvoří heterogenní skupinu onemocnění, která jsou charakterizována morfoloogickou a funkční poruchou srdečního svalu. Do této skupiny patří hypertrofická kardiomyopatie (HCM), dilatační kardiomyopatie (DCM), arytmogenní kardiomyopatie (ACM), nonkompaktní kardiomyopatie (LVNC) a restriktivní kardiomyopatie (RCM). Primární poruchy elektrické vodivosti neboli kanálopatie je skupina onemocnění způsobená mutacemi postihujícími geny, které kódují iontové kanály a/nebo jejich regulační proteiny, což vede k modifikaci akčního potenciálu či změně při využití vápenatých iontů buňkou. To ve výsledku vede k život ohrožujícím ventrikulárním arytmiím. Do této skupiny patří syndrom dlouhého či krátkého QT intervalu (LQT, SQT), Brugádův syndrom (BrS), katecholaminergní polymorfni komorová tachykardie (CPVT), idiopatická ventrikulární fibrilace (IVF) či syndrom časné repolarizace. Mezi nejčastější zástupce vrozeného onemocnění koronárních tepen patří Marfanův syndrom, Loeys-Dietzův syndrom či Ehlers-Danlosův syndrom.

Náš tým zde prezentuje skupinu náhle zemřelých mladých osob do 40 let věku, které byly v průběhu pilotní studie vyšetřeny ve spolupráci s ústavu soudního lékařství v ČR metodou NGS. Studie navazuje na naše několikaleté zkušenosti s molekulárně genetickým testováním pacientů s různými dědičnými kardiovaskulárními onemocněními. Naším cílem je tak nejen zachycení co nejvyššího počtu kauzálních variant v genech spojených s dědičnou srdeční chorobou u obětí SCD, ale také poskytnutí včasného a důkladného kardiologického vyšetření a léčby relevantním příbuzným v riziku náhlé srdeční smrti.

Spolupracující centra

1. Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol, Praha
2. Klinika kardiologie, Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
3. Ústav soudního lékařství a toxikologie, Krajská nemocnice Liberec
4. Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN, Praha
5. Ústav soudního lékařství 2. LF UK a Nemocnice Na Bulovce, Praha
6. Ústav soudního lékařství 3. LF UK, Praha
7. Dětské kardiocentrum 2. LF UK a FN Motol, Praha
8. I. interní klinika - kardiologická, FN Olomouc a LF Univerzity Palackého
9. Ústav soudního lékařství LF UK a FN v Hradci Králové
10. Klinika dětí a dorostu 3. LF a FN Královské Vinohrady, Praha

Případy zařazené do studie

V rámci studie se nám dosud podařilo zdokumentovat 86 případů (64 mužů a 22 žen) náhle zemřelých jedinců od 0 do 40 let věku. Na základě pitvy bylo onemocnění srdce stanoveno jako příčina úmrtí u 50 případů (58,1 %). Jednalo se o HCM (20/86), ACM (20/86), DCM/LVNC (10/86). U 15 případů (17,4 %) nebylo zjištěno strukturální onemocnění srdce, u 9 případů se jednalo o syndrom náhlého úmrtí kojence (SIDS) a v dalších případech se jednalo o akutní disekci aorty či myokarditidu. V jednom případě rodina odmítla dát ke genetickému vyšetření souhlas.

Metodika

DNA obětí SCD, získaná post-mortem, byla podrobena vyšetření metodou NGS custom panelem genů. Na začátku studie bylo u každého vzorku vyšetřeno 229 genů spojených s dědičnou srdeční chorobou. Později byl na základě zkušeností počet genů snížen na 100, což umožnilo kvalitnější pokrytí cílových oblastí a CNV analýzu. Sekvenace probíhá na sekvenačních systémech MiniSeq/MiSeq (Illumina). NGS data jsou procesována pomocí Burrows-Wheeler aligner (BWA) následovaném GATK analýzou a filtrována softwarem VariantStudio/Variant Interpreter (Illumina) či Sophia DDM (Sophia Genetics). Nalezené varianty jsou hodnoceny na základě ACMG klasifikace a porovnány s pitevní diagnózou. Následně je prováděna segregace analýza na přítomnost těchto variant u relevantních příbuzných v riziku metodou Sangerova sekvenování. V současné době probíhá testování panel-negativních vzorků pomocí klinického exomu zahrnujícího přibližně 5 tisíc klinicky významných genů na přístroji NextSeq (Illumina).

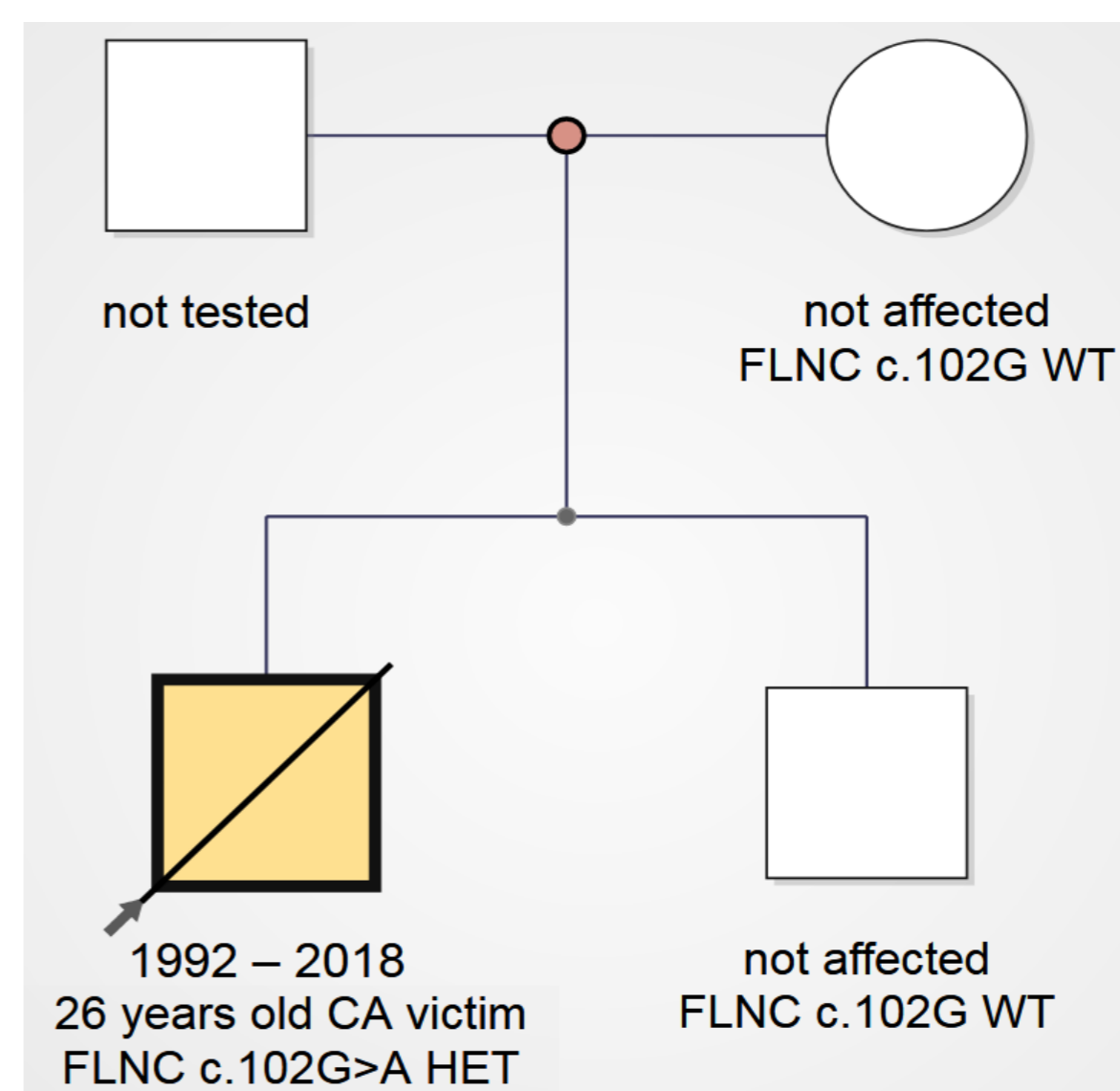
Výsledky

V dosud testované skupině 57 případů SCD se nám podařilo prokázat velmi pravděpodobně kauzální varianty (class 4-5) u 10/57 obětí SCD (17,5 %). Varianty byly prokázány v genech *RYR2*, *FLNC*, *TTN*, *KCNH2*, *SCN5A*, *ABCC9*, *DES* a *KCNQ1*. Možná příčina úmrtí, kdy je však potřeba doplnit kardiologická a genetická vyšetření příbuzných (varianty class 3) byly nalezeny u 13/57 SCD případů (22,8 %). Tyto varianty byly nalezeny v genech *RYR2*, *CTNNA3*, *SCN10A*, *MYLK2*, *KCNE3*, *MYH7*, *ANK2* a *DPP6*. Ve 3 případech byl nalezen známý rizikový faktor pro léky vyvolaný LQT syndrom (*KCNE1* p.Asp85Asn). Ve skupině SIDS nebyla nalezena žádná kauzální varianta.

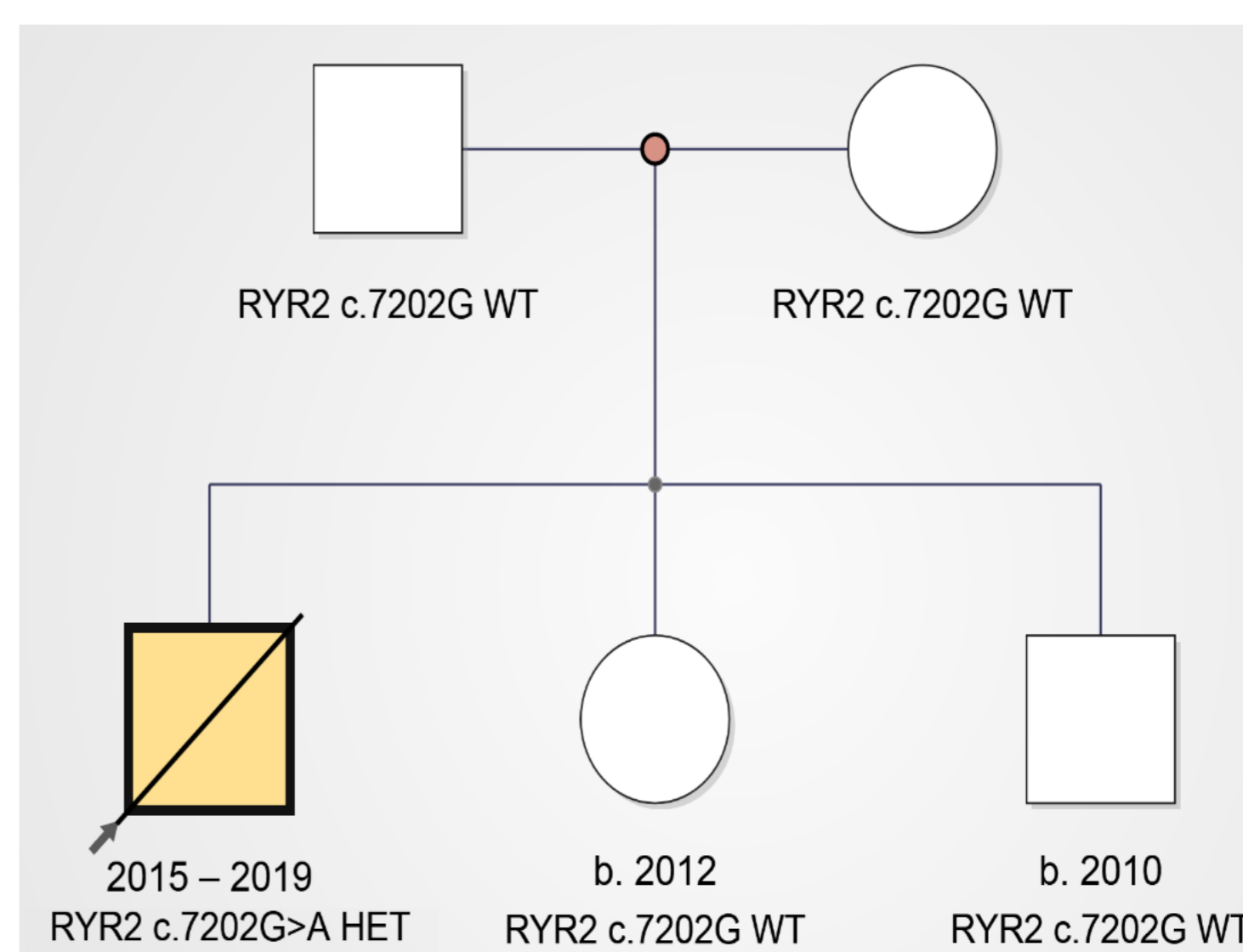
Tabulka č. 1: Patogenní a pravděpodobně patogenní varianty nalezené u obětí SCD:

Varianta:	Protein:	ACMG klasifikace:	Třída:
NM_001267550.1(TTN):c.44899C>T	(p.Arg14967*)	PVS1, PM2, PP3	5
NM_001458.4(FLNC):c.102G>A	(p.Trp34*)	PVS1, PM2, PP3, PP5	5
NM_001256850.1(TTN):c.41745_41748del	(p.Glu13916Profs*28)	PVS1, PM2, PP3	5
NM_020297.2(ABCC9):c.2425-1G>T		PVS1, PM2, PP3	5
NM_001035.2(RYR2):c.7202G>A	(p.Arg2401His)	PS2, PM2, PP3, PP5	4
NM_000238.3(KCNH2):c.43del	(p.Leu15Trpfs*45)	PVS1, PM2, PP1	5
NM_000218.2(KCNQ1):c.590C>T	(p.Pro197Leu)	PM1, PM2, PM5, PP2, PP3	4
NM_001256850.1(TTN):c.41745_41748del	(p.Glu13916Profs*28)	PVS1, PM2, PP3	5
NM_001099405.1(SCN5A):c.4222G>A	(p.Gly1408Arg)	PS1, PM1, PM2, PP2, PP3, PP5	5
NM_001927.3(DES):c.976C>T	(p.His326Tyr)	PM1, PM2, PP2, PP3	4

Obrázek č. 1: Patogenní varianta v genu *FLNC* u 26-leté oběti SCD:



Obrázek č. 2: Pravděpodobně patogenní de novo varianta v genu *RYR2* u 4-leté oběti SCD



Závěr a diskuze

Dosud získané výsledky ukazují na velmi prospěšnou spolupráci kardiologických pracovišť, genetických laboratoří a ústavů soudního lékařství zapojených do této studie. U části obětí SCD se podařilo molekulární analýzou potvrdit závěry pitvy, někde dokonce molekulární pitva umožnila objasnit příčinu úmrtí tam, kde klasickou pitvou nebylo možné zjistit žádnou strukturální abnormalitu srdce nebo cév. Příbuzní obětí SCD, u nichž byla prokázána patogenní mutace, se tak včas dostávají pod dozor na specializovaných kardiologických pracovištích.

Skutečnost, že v rámci vyšetření některých případů SCD bylo nalezeno několik možných kauzálních variant v kardiogenech, ukazuje na možnost jejich kumulativního účinku. Stejně tak častou přítomností některého probíhajícího infekčního onemocnění, kterou jsme zaznamenali u části obětí, nelze vyloučit jako rizikový faktor SCD. Podle očekávání nebyla ve skupině SIDS odhalena žádná kauzální varianta a jejich vyšetření tak bude rozšířeno o celoxomové sekvenování.