

Streszczenie

lekarz Agata Paszkowska

Analiza kliniczna i molekularna kardiomiopatii pod postacią niescalenia mięśnia lewej komory u dzieci.

Postęp wiedzy w zakresie kardiomiopatii u dzieci, jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat umożliwił ich bardziej wiarygodne rozpoznawanie, określenie etiologii choroby, wdrożenie odpowiedniego postępowania terapeutycznego, a także ocenę występowania czynników ryzyka niepomyślnego rokowania w tej grupie chorych.

Kardiomiopatia z niescalenia mięśnia lewej komory (LVNC) od 2006 roku uznawana jest za odrębną postać kardiomiopatii u dzieci, która może występować jako forma izolowana lub też współistnieć z wadami wrodzonymi serca, zespołem genetycznym, zaburzeniami metabolicznymi lub chorobami nerwowomięśniowymi. LVNC jest rzadką postacią kardiomiopatii w populacji pediatrycznej, jakkolwiek doniesienia piśmiennictwa wskazują, że jest trzecią co do częstości występowania po kardiomiopatii rozstrzeniowej i przerostowej. Charakteryzuje się wzmożonym beleczkowaniem i obecnością dwóch warstw mięśnia lewej komory (LK). Warstwa wewnętrzna miokardium zawiera liczne belecзки, pomiędzy którymi znajdują się głębokie zatoki mające połączenie z jamą LK serca. Warstwę zewnętrzną stanowi scalony, prawidłowy mięsień sercowy. Zmiany te zlokalizowane są głównie w LK serca, najczęściej obejmują koniuszek serca oraz ścianę boczną, rzadziej występują w przegrodzie międzykomorowej oraz w prawej komorze. Za rozwój LVNC najczęściej odpowiadają mutacje genów kodujących białka sarkomeru sercowego, białka cytoszkieletu, kanałów jonowych oraz błony jądrowej. W literaturze zagadnienia raportowana jest różna liczba genów korelujących z występowaniem LVNC [1,20,30,54,56-58]. Podłoże molekularne choroby nie zostało do końca poznane i wciąż trwają badania ukierunkowane na ten cel. Wyniki badań wykazały, że identyfikacja patogennych wariantów molekularnych w LVNC wynosi od 10% do 50%. Analiza podłoża molekularnego u dzieci z LVNC jest niezwykle istotna i niezbędna w identyfikacji nosicieli patogennych zmian wśród członków rodziny chorego.

Kardiomiopatia z niescalenia mięśnia lewej komory jest klinicznie i genetycznie niejednorodną postacią patologii mięśnia sercowego. Nieliczne doniesienia w piśmiennictwie dotyczą tej postaci kardiomiopatii w populacji pediatrycznej. Postęp w diagnostyce obrazowej chorób mięśnia sercowego, takich jak echokardiografia i badanie serca metodą rezonansu magnetycznego oraz rozwój badań molekularnych wpłynęły na wzrost częstości rozpoznawania, zrozumienie etiopatogenezy oraz większą świadomość na temat tej choroby. Jednakże, wciąż pozostaje wiele zagadnień wymagających dalszych badań klinicznych i naukowych. Do chwili obecnej nie zostały jeszcze opracowane spójne i ogólnie zaakceptowane kryteria diagnostyczne oceny morfologicznej niescalonego mięśnia sercowego oraz nie przedstawiono odrębnych zaleceń dotyczących rozpoznawania LVNC w populacji pediatrycznej. Wiele doniesień literatury dotyczących podłoża molekularnego LVNC opiera się na wynikach badań przeprowadzonych tylko u pacjentów dorosłych. Wyniki badań u dzieci z LVNC najczęściej oparte są na małych liczebnie grupach pacjentów. Według naszej wiedzy, w dotychczasowych doniesieniach nie przedstawiono wyników badań w polskiej populacji dzieci z LVNC.

Celem mojej rozprawy doktorskiej było określenie fenotypu morfologicznego kardiomiopatii z niescalenia mięśnia lewej komory u dzieci na podstawie aktualnych metod diagnostycznych, analiza

przebiegu klinicznego choroby oraz identyfikacja znanych i nowych czynników genetycznych biorących udział w etiopatogenezie LVNC.

Badanie przeprowadzone w ramach projektu rozprawy doktorskiej obejmowało grupę 31 pacjentów pediatrycznych z echokardiograficznym rozpoznaniem izolowanej postaci kardiomiopatii z niescalenia mięśnia lewej komory, kolejno hospitalizowanych w Klinice Kardiologii Instytutu „Pomnik Centrum Zdrowia Dziecka” w latach 2008 – 2021. Kryterium włączenia do badania był wiek pacjenta <18 lat w momencie rozpoznania choroby oraz echokardiograficzne cechy izolowanej postaci LVNC zdefiniowanej jako: (1) Obecność struktury dwuwarstwowej mięśnia lewej komory ze scaloną (C) i niescaloną (NC) warstwą mięśnia z beleczkami i głębokimi zachyłkami międzybeleczkowymi; (2) Maksymalny końcowoskurczowy stosunek warstw NC/C >2 ; (3) Dowód na obecność głębokich zachyłków międzybeleczkowych wypełniających się krwią napływającą z lewej komory w badaniu metodą kolorowego Dopplera. Kryterium wykluczenia z badania była obecność wrodzonej wady serca, innych postaci kardiomiopatii lub zaburzeń nerwowomięśniowych. Mediana wieku pacjentów wynosiła 11 (6–13) lat. Badani pacjenci byli prospektywnie obserwowani przez okres 5 lat [mediana 5,1 (IQR 2.2–12.2) lat].

Obraz kliniczny kardiomiopatii z niescalenia mięśnia lewej komory charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem prezentacji klinicznej, od przypadków całkowicie bezobjawowych do ciężkiej niewydolności serca, zagrażających życiu zaburzeń rytmu serca, powikłań zakrzepowo-zatorowych oraz nagłego zgonu sercowego.

Celem pracy pt. „*Spectrum of clinical features and genetic profile of left ventricular noncompaction cardiomyopathy in children*” była identyfikacja cech klinicznych i profilu genetycznego dzieci z izolowaną postacią kardiomiopatii z niescalenia mięśnia lewej komory badanych w jednym ośrodku referencyjnym kardiologii dziecięcej. U wszystkich dzieci oceniono występujące objawy kliniczne takie jak ból w klatce piersiowej, kołatania serca, omdlenia, zdarzenia zakrzepowo-zatorowe, klasę czynnościową NYHA/Ross oraz wywiad rodzinny w kierunku kardiomiopatii i nagłego zgonu sercowego. Analizowano wyniki badania echokardiograficznego z oceną wymiaru i funkcji skurczowej LK, wartości stosunku NC/C i wizualizacją wypełnienia zachyłków międzybeleczkowych krwią napływającą z LK, zgodnie z kryteriami Jenni (wartość NC/C ≥ 2 w fazie skurczu). Oceniono zmiany w spoczynkowym zapisie EKG, 24-godzinnym badaniu Holter EKG, w krążeniowo-oddechowym teście wysiłkowym (CPET) oraz w badaniu serca metodą rezonansu magnetycznego (CMR) z analizą wartości NC/C i obecności włóknienia mięśnia sercowego. Kryteria rozpoznania LVNC w badaniu CMR oparto na ocenie stosunku warstwy NC/C mięśnia sercowego LK $>2,3$ w fazie końcoworozkurczowej. U wszystkich pacjentów oceniono stężenie NT-proBNP w surowicy krwi oraz wykonano badania genetyczne w celu oceny molekularnego podłoża choroby (zastosowano sekwencjonowanie nowej generacji oraz ukierunkowany panel 165 genów związanych z kardiomiopatią). Sekwencjonowanie metodą Sangera zostało wykorzystane do weryfikacji najistotniejszych pod względem patogenności oraz korelacji genotyp-fenotyp wariantów molekularnych u probanta oraz do analizy ich segregacji w rodzinie. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że najczęstszym objawem klinicznym LVNC w analizowanej grupie dzieci była niewydolność serca oraz zaburzenia rytmu i przewodzenia, natomiast rzadko stwierdzano występowanie incydentów zakrzepowo-zatorowych i zespołów genetycznych. Wyniki badań własnych potwierdziły dane z piśmiennictwa, że badaniem pierwszego wyboru w diagnostyce obrazowej LVNC powinna być echokardiografia przezklatkowa, niemniej jednak obrazowanie serca metodą CMR jest zalecane w celu potwierdzenia rozpoznania. Wykazano również dobrą korelację badania CMR z echokardiografią oraz wysoką czułość i swoistość CMR w wykrywaniu niescalonych segmentów oraz

ognisk włóknienia mięśnia sercowego. Wyniki przeprowadzonej analizy podkreśliły rolę wywiadu rodzinnego oraz badań genetycznych, które umożliwiły wyjaśnienie etiologii molekularnej LVNC u ponad połowy (53%) badanych dzieci. Identyfikacja przyczyny genetycznej LVNC pozwala na przeprowadzenie stratyfikacji ryzyka niepomyślnego przebiegu klinicznego choroby oraz umożliwia wiarygodne poradnictwo genetyczne pacjentom i ich krewnym (*Spectrum of Clinical Features and Genetic Profile of Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy in Children. Cardiogenetics 2021; Vol. 11, Nr 4, 191-203*).

W ciągu ostatnich 30 lat zaproponowano różne kryteria echokardiograficzne, aby odróżnić LVNC od fizjologicznego nadmiernego beleczkowania mięśnia sercowego i innych form kardiomiopatii. Badaniem pierwszego wyboru w diagnostyce LVNC jest badanie echokardiograficzne przezklatkowe, jednak wciąż nie ma zgodności co do definitywnych kryteriów rozpoznania LVNC. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że nadal brak jest specyficznych dla populacji pediatrycznej kryteriów diagnostycznych LVNC, a w codziennej praktyce klinicznej opieramy się na wytycznych opracowanych dla pacjentów dorosłych, najczęściej kryteriach Jenni i wsp. Coraz większe znaczenie w rozpoznawaniu LVNC ma badanie serca metodą rezonansu magnetycznego, jednak stosunkowo niewiele jest doniesień dotyczących wyników tych badań w populacji pediatrycznej. Celem badania przeprowadzonego w ramach rozprawy doktorskiej była ocena wyników echokardiografii oraz badania serca metodą rezonansu magnetycznego w grupie dzieci z izolowaną postacią kardiomiopatii z niescalenia mięśnia lewej komory. U wszystkich dzieci wykonano pomiary echokardiograficzne w oparciu o kryteria Jenni: obliczono stosunek warstwy niescalonej (NC) do scalonej (C) mięśnia LK mierzony w projekcji przymostkowej w osi krótkiej w fazie końcowoskurczowej (wartość $NC/C \geq 2,0$ potwierdzała rozpoznanie LVNC), wykonano badanie metodą kolorowego Dopplera z wizualizacją napełniania przestrzeni między beleczkami krwią dopływającą z LK. Ponadto, oceniono wymiar i funkcję skurczową LK przy użyciu metody Simpsona oraz wymiar i funkcję prawej komory (PK) serca. Wartość frakcji wyrzutowej LK poniżej 55% przyjęto jako obniżoną. Dla wszystkich parametrów echokardiograficznych obliczono wartość z-score przy użyciu wzoru na z-score podanego w literaturze. W badaniu CMR, zgodnie z kryteriami Petersena grubość warstwy scalonej i niescalonej mięśnia sercowego mierzono w końcowej fazie rozkurczu, wartość $NC/C > 2,3$ potwierdzała rozpoznanie LVNC. W celu oceny obecności i rozległości włóknienia mięśnia sercowego rejestrowano obrazy późnego wzmocnienia po podaniu kontrastu gadolinium (LGE). Oceniano również wymiar i funkcję skurczową LK i PK serca, masę LK i porównano je z opublikowanymi wartościami normatywnymi CMR dla dzieci i młodzieży. Wartości z-score $> 2,0$ lub $< -2,0$ uwzględniano jako nieprawidłowe. Wyniki badań własnych wykazały, że w ocenie morfologicznej niescalenia mięśnia sercowego istnieje bardzo dobra zgodność między echokardiografią a obrazowaniem serca metodą CMR. Wykazano istotną korelację w ocenie stosunku NC/C w pomiarach końcowoskurczowych w echokardiografii (zgodnie z kryteriami Jenni) i końcoworozkurczowych w badaniu CMR (zgodnie z kryteriami Petersena). Na podstawie przeprowadzonej analizy wykazano, że echokardiografia jest dobrą metodą monitorowania funkcji skurczowej LK, natomiast badanie CMR jest wskazane do wiarygodnej oceny lewej komory i jej powiększenia. Istotnym wnioskiem z badania jest fakt, że badanie CMR znacznie przewyższa echokardiografię w ocenie prawej komory u dzieci z LVNC i powinno być włączone do podstawowej diagnostyki tych pacjentów. Ponadto, obrazowanie CMR pozwala na wykrycie obszarów LGE wskazujących na zwłóknienie mięśnia sercowego. W naszym badaniu prawie jedna czwarta dzieci z LVNC miała cechy włóknienia mięśnia sercowego w badaniu CMR, co ma istotne znaczenie kliniczne, gdyż obecność LGE jest uznanym czynnikiem ryzyka incydentów sercowo-naczyniowych (*Imaging Features of Pediatric Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy in Echocardiography and Cardiovascular Magnetic Resonance. Journal of Cardiovascular Development and Disease 2022; Vol. 9, Nr 3, 77*).

Kardiomiopatia z niescalenia mięśnia lewej komory jest genetycznie niejednorodną chorobą mięśnia sercowego, obejmującą wiele genów, najczęściej kodujących białka sarkomeru sercowego, cytoszkieletu lub kanałów jonowych. Doniesienia piśmiennictwa wykazują, że identyfikacja patogennych wariantów molekularnych u chorych z LVNC wynosi od 10% do 50%, a przypadki rodzinnego występowania choroby stanowią 20-40%. Opisano różne sposoby dziedziczenia tej postaci kardiomiopatii: autosomalny dominujący, autosomalny recesywny lub sprzężony z chromosomem X. W większości przypadków wiedza na temat profilu genetycznego LVNC bazuje na wynikach badań wykonanych w grupie pacjentów dorosłych, co skłoniło nas do przeprowadzenia badań na ten temat w populacji dzieci z LVNC. Celem pracy pt. „*Genetic profile of left ventricular noncompaction cardiomyopathy in children -a single reference center experience*” było określenie podłoża molekularnego izolowanej postaci LVNC w grupie dzieci hospitalizowanych w jednym ośrodku kardiologicznym oraz poszerzenie wiedzy na temat genetycznej etiologii tej rzadkiej choroby. Do badania włączono 31 pacjentów z dwudziestu dziewięciu rodzin (dwa rodzeństwa) z echokardiograficznym rozpoznaniem (zgodnie z kryteriami Jenni i wsp.) izolowanej LVNC. U wszystkich pacjentów oceniono ich stan kliniczny, klasę czynnościową NYHA/Rossa, wartość NTproBNP w surowicy krwi, występujące objawy kliniczne oraz wykonano badanie echokardiograficzne, elektrokardiograficzne spoczynkowe i 24 godzinne metodą Holtera, badania genetyczne. Badanie serca metodą rezonansu magnetycznego (CMR) z oceną włóknienia mięśnia sercowego wykonano u 25 pacjentów, bez przeciwwskazań do CMR. Analizowane dane obejmowały również wywiad rodzinny dotyczący występowania kardiomiopatii, zaburzeń rytmu serca i zaburzeń przewodzenia przedsionkowo-komorowego, epizodów zakrzepowo-zatorowych oraz nagłego zgonu sercowego u członków rodzin. U wszystkich 31 pacjentów wykonano badania genetyczne w celu identyfikacji podłoża molekularnego choroby. Preparaty DNA zostały automatycznie wyekstrahowane z krwi obwodowej każdego uczestnika badania za pomocą aparatu MagCore Nucleic Acid Extractor HF16Plus zgodnie z protokołem producenta. U większości pacjentów przeprowadzono sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) przy użyciu systemu HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA, USA) z oryginalnym panelem opracowanym w Zakładzie Genetyki Medycznej IPCZD zawierającym 1000 klinicznie istotnych genów, w tym 165 związanych z kardiomiopatią, a w jednym przypadku z panelem komercyjnym TruSight One, obejmującym 222 geny związane z kardiomiopatią. W dwóch przypadkach jako kolejny test molekularny zastosowano sekwencjonowanie całego eksomu (WES). Wszystkie warianty o wysokim priorytecie zostały potwierdzone przez sekwencjonowanie metodą Sangera u probanta i u dostępnych rodziców. Zweryfikowane warianty molekularne sklasyfikowano jako patogenne (ang. *pathogenic*; P), prawdopodobnie patogenne (ang. *likely pathogenic*; LP) oraz warianty o niepewnym znaczeniu (ang. *variant of uncertain significance*; VUS). W przeprowadzonej analizie molekularnej za pomocą ukierunkowanego panelu genów związanych z kardiomiopatią w połączeniu z sekwencjonowaniem wg Sangera zidentyfikowano 16 różnych wariantów molekularnych (w tym 10 nowych wariantów), w 11 genach u 16 pacjentów (w 15 niespokrewnionych spośród 29 rodzin), dając 52% wskaźnik wykrywalności podłoża molekularnego LVNC. W naszej grupie dzieci najczęściej warianty molekularne stwierdzano w genach kodujących białko kanału jonowego *HCN4* (n = 4), białko sarkomeru sercowego *MYH7* (n = 2) oraz w genie kodującym białko regulatorowe *PRDM16* (n = 2). Pozostałe warianty wykryto tylko raz w pojedynczych rodzinach. Na podstawie przeprowadzonej analizy korelacji fenotypu i przebiegu klinicznego choroby z genotypem LVNC wykazano znaczący związek i wpływ podłoża molekularnego na występowanie określonych postaci LVNC i rokowanie. W grupie pacjentów z potwierdzonym patogennym wariantem molekularnym choroby najczęściej występowały zaburzenia rytmu serca, głównie pod postacią nieutralonego częstoskurczu komorowego oraz bradykardia zatokowa. Wśród dzieci z LVNC i potwierdzonym wariantem patogennym stwierdzano również incydenty zakrzepowo-zatorowe oraz zgony. W grupie dzieci z LVNC, ale bez potwierdzonego

patogennego wariantu molekularnego dominowały objawy niewydolności serca oraz obecność ognisk włóknienia mięśnia sercowego stwierdzonych w badaniu CMR. Na podstawie wyników przeprowadzonego badania, które jest pierwszą analizą prospektywną opisującą charakterystykę molekularną polskich pacjentów pediatrycznych z LVNC wykazano, że wykorzystanie szerokiego panelu genów związanych z kardiomiopatią umożliwiło zidentyfikowanie patogennych wariantów molekularnych u ponad połowy badanych pacjentów (52%). U większości dzieci podłoże molekularne korelowało z występowaniem zaburzeń rytmu serca, zgonem i dodatnim wywiadem rodzinnym w kierunku kardiomiopatii. Wykonane badania genetyczne pozwoliły również na identyfikację przypadków o specyficznych fenotypach choroby, związanych z ciężkim przebiegiem klinicznym i występowaniem zdarzeń niepożądanych, a ujemny wynik testu genetycznego nie wyklucza klinicznego rozpoznania LVNC. Istotnym przesłaniem przeprowadzonego badania jest również podkreślenie roli poradnictwa genetycznego, które jest integralną częścią postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u dzieci z LVNC (*Genetic Profile of Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy in Children - A Single Reference Center Experience. Genes 2022; Vol. 13, Nr 8, 1334*).

W literaturze zagadnienia przedstawiono pojedyncze doniesienia o współistnieniu LVNC u dzieci z bradykardią zatokową, co sugeruje możliwość wspólnej przyczyny tych dwóch chorób. Choć rozpoznano rodzinne postaci pierwotnej bradykardii zatokowej, to przypisano je wariantom w genach *HCN4*, *SCN5A* i *ANK2*. Jednak w literaturze zagadnienia istnieje bardzo niewiele doniesień na temat związku między defektami genu *HCN4* a LVNC. Celem badania przeprowadzonego w ramach rozprawy doktorskiej była charakterystyka fenotypu klinicznego rodzin z kardiomiopatią z niescalenia mięśnia lewej komory i bradykardią zatokową, u podłoża których stwierdzone zostały patogenne warianty molekularne w genie *HCN4*. Szczegółowa ocena dotyczyła wpływu zidentyfikowanych patogennych wariantów molekularnych w genie *HCN4* na prezentację kliniczną rodzin z LVNC. Do badania włączono 6 pacjentów [mediana wieku 11 (IQR 6–16)] lat z rozpoznaniem LVNC, z 4 rodzin, kolejno hospitalizowanych w Klinice Kardiologii IPCZD. Kryteriami włączenia był wiek <18 lat w momencie rozpoznania LVNC, bradykardia zatokowa w elektrokardiogramie, rodzinne występowanie LVNC oraz echokardiograficzne cechy izolowanej postaci LVNC. U wszystkich pacjentów analizowano występowanie objawów klinicznych, oceniano klasę czynnościową NYHA/Rossa, oznaczono poziom NT-proBNP w surowicy krwi, przeprowadzono dokładny wywiad rodzinny dotyczący występowania kardiomiopatii i nagłego zgonu sercowego u członków rodziny, a także oceniano wyniki echokardiografii, spoczynkowego zapisu EKG z oceną częstości rytmu serca (HR), 24-godzinne badania EKG metodą Holtera z analizą minimalnego, maksymalnego, średniego dobowego rytmu serca, występowania pauz rytmu zatokowego > 2 sek oraz wykonano obrazowanie serca metodą rezonansu magnetycznego.

U każdego pacjenta wykonano sekwencjonowanie genów kandydujących (związanych z kardiomiopatią) przy użyciu panelu TruSight One Sequencing Panel (Illumina) w jednej rodzinie i oryginalnego panelu pediatrycznego opracowanego w Zakładzie Genetyki Medycznej IPCZD obejmującego 1000 klinicznie istotnych genów (Roche) w pozostałych rodzinach. Wyniki wykonanych badań molekularnych wykazały obecność rzadkich heterozygotycznych wariantów w genie *HCN4* w trzech spośród czterech rodzin (łącznie u czterech pacjentów). Analiza danych udowodniła wpływ wariantów molekularnych w genie *HCN4* na obecność złożonego fenotypu choroby, na który składa się kardiomiopatia z niescalenia mięśnia lewej komory, bradykardia zatokowa oraz poszerzenie aorty wstępującej. Wyniki badań własnych wykazały, że warianty molekularne *HCN4* mogą być związane z wczesnym wystąpieniem objawów klinicznych i ciężkim przebiegiem choroby. Wykazano również, że u pacjentów z LVNC i bradykardią zatokową, szczególnie ważna jest ocena ognisk włóknienia mięśnia sercowego nie tylko w obrębie komór, ale także w obrębie przedsionków serca. U pacjentów ze złożonym fenotypem choroby obejmującym

występowanie LVNC, bradykardii zatokowej, poszerzenia aorty wstępującej należy weryfikować obecność wariantów molekularnych w genie *HCN4*, co ma duże znaczenie terapeutyczne oraz prognostyczne w tej grupie chorych (*Clinical Presentation of Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy and Bradycardia in Three Families Carrying HCN4 Pathogenic Variants. Genes 2022; Vol. 13, Nr 3, 477*).