Streszczenie rozprawy na stopień doktora nauk medycznych w zakresie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

pt.

Uwarunkowana genetycznie kardiomiopatia rozstrzeniowa – charakterystyka kliniczna, rola biomarkerów, rokowanie.

Rozprawa w formie cyklu publikacji

Lek. Przemysław Chmielewski

Promotor: prof. dr hab. n. med. Zofia T. Bilińska

Praca doktorska została zrealizowana w ramach grantu DETECTin-HF

finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w programie ERA-CVD

Cykl publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej

1. Titin Truncating Variants in Dilated Cardiomyopathy - Prevalence and Genotype-Phenotype Correlations.

Franaszczyk M., Chmielewski P., Truszkowska G., Stawiński P., Michalak E., Rydzanicz M., Sobieszczańska-Małek M., Pollak A., Szczygieł J., Kosińska J., Parulski A., Stokłosa T., Tarnowska A., Machnicki M.M., Foss-Nieradko B., Szperl M., Sioma A., Kuśmierczyk M., Grzybowski J., Zieliński T., Płoski R., Bilińska Z.T.

PLoS One. 2017 Jan 3;12(1):e0169007. doi: 10.1371/journal.pone.0169007. eCollection 2017. PMID: 28045975

IF 2,766

2. Can Circulating Cardiac Biomarkers Be Helpful in the Assessment of *LMNA* Mutation Carriers?

Chmielewski P., Michalak E., Kowalik I., Franaszczyk M., Sobieszczańska-Małek M., Truszkowska G., Stępień-Wojno M., Biernacka E.K., Foss-Nieradko B., Lewandowski M., Oręziak A., Bilińska M., Kuśmierczyk M., Tesson F., Grzybowski J, Zieliński T., Płoski R., Bilińska Z.T.

Journal of Clinical Medicine. 2020 May 12;9(5):1443. doi: 10.3390/jcm9051443. PMID: 32408651

IF 5,688

3. Titin-Related Dilated Cardiomyopathy: The Clinical Trajectory and the Role of Circulating Biomarkers in the Clinical Assessment.

Chmielewski P., Truszkowska G., Kowalik I., Rydzanicz M., Michalak E., Sobieszczańska-Małek M., Franaszczyk M., Stawiński P., Stępień-Wojno M., Oręziak A, Lewandowski M., Leszek P., Bilińska M., Zieliński T., Płoski R., Bilińska Z.T.

Diagnostics (Basel). 2022;12(1):13. doi: 10.3390/diagnostics12010013. PMID: 35054181

IF 3,706

Wstęp

Kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM) jest chorobą o dużym znaczeniu społecznym, często dotyczy osób młodych, ogranicza ich aktywność zawodową i rodzinną, może prowadzić do nagłego zgonu sercowego czy schyłkowej niewydolności serca. Cechuje się znacznym zróżnicowaniem fenotypowym, a w przedklinicznej fazie choroby może przebiegać m.in. pod postacią izolowanej rozstrzeni lewej komory lub zaburzeń rytmu serca.

Etiologia DCM jest złożona, wiadomo jednak, że bardzo ważną rolę odgrywają czynniki genetyczne. Zróżnicowanie przebiegu klinicznego, rokowania i odpowiedzi na leczenie wynika w dużej mierze właśnie z heterogenności etiologicznej, w tym ze złożoności tła genetycznego, obejmującego kilkadziesiąt genów kodujących białka należące do różnych kompartmentów komórkowych kardiomiocyta. Poznanie tła genetycznego i wynikających z niego odrębności przebiegu choroby może przyczynić się - zgodnie z postulatami medycyny spersonalizowanej - do opracowania nowych metod leczenia, potencjalnie bardziej skutecznych, ponieważ nakierowanych na mechanizm powstawania choroby.

W ostatnich latach dokonuje się ogromny postęp wiedzy w tym zakresie. Tym niemniej historia naturalna tych rzadkich chorób jest nadal mało poznana, co utrudnia podejmowanie decyzji klinicznych.

Genami, w których najczęściej stwierdzane są patogenne warianty (mutacje) odpowiadające za rozwój DCM, są *TTN* i *LMNA*.

Gen *LMNA*, kodujący białko otoczki jądrowej laminę, był pierwszym zidentyfikowanym genem, którego mutacje warunkują rozwój DCM dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący. Odpowiadają one za ok. 6% przypadków DCM.

Kardiomiopatia uwarunkowana mutacjami w *LMNA* odróżnia się od większości przypadków DCM szybką progresją choroby i charakteryzuje się dużą częstością poważnych zdarzeń niepożądanych, zarówno arytmicznych, obejmujących nagły zgon sercowy, jak i związanych z niewydolnością serca (HF), prowadzących do jej schyłkowej postaci. W przebiegu kardiolaminopatii wcześnie stwierdza się zwykle wystąpienie bloku przedsionkowo-komorowego i nadkomorowych zaburzeń rytmu serca, wyprzedzających

pojawienie się arytmii komorowej i objawów HF.

W 2002 r. wykazano po raz pierwszy, że DCM może być również uwarunkowana mutacjami w genie *TTN,* kodującym białko mięśni poprzecznie prążkowanych tytynę, stanowiące składnik podporowy sarkomeru. Wdrożenie pod koniec pierwszej dekady XXI wieku metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) ułatwiło wykrywanie mutacji w dużych genach, takich jak *TTN*. W 2012 r. ukazała się pierwsza praca oceniająca częstość występowania mutacji w *TTN* u chorych z DCM. Początkowo jednak ich rola etiologiczna była kwestionowana. Jeszcze w opublikowanym w 2015 r. europejskim atlasie dziedzicznego podłoża DCM mutacji skracających *TTN* nie uznawano za najczęstsze. Aktualnie wiadomo, że warianty skracające *TTN* (*TTN*tv) są najczęstszą genetyczną przyczyną DCM, identyfikowaną w ok. 20% przypadków DCM.

Wykazano, że rokowanie w kardiotytynopatii jest podobne jak w innych postaciach DCM. Stwierdzano dobrą odpowiedź na klasyczne leczenie HF. Zagrożenie zaburzeniami rytmu serca w kardiotytynopatii nie zostało dobrze określone, choć wykazano, że obecność *TTNtv* stanowi czynnik ryzyka utrwalonej arytmii komorowej w populacji pacjentów z DCM i wszczepionym kardiowerterem-defibrylatorem (ICD).

Kardiomiopatie uwarunkowane mutacjami w *TTN* i *LMNA* należą do najlepiej scharakteryzowanych fenotypowo. W dotychczasowych opracowaniach brakowało jednak oceny profilu biomarkerów pod kątem ich przydatności diagnostycznej oraz rokowniczej. Szczególnie duże znaczenie ma ocena ryzyka nagłego zgonu sercowego, ponieważ może ułatwić podjęcie decyzji o profilaktycznym wszczepieniu ICD u najbardziej zagrożonych osób.

Zidentyfikowanie mutacji odpowiadającej za rozwój DCM u probanta umożliwia poszukiwanie jej nosicieli w rodzinach chorych, którzy są obarczeni wysokim ryzykiem rozwoju choroby (nawet jeśli aktualnie pozostają bezobjawowi) i wymagają okresowego powtarzania badań w celu jej wykrycia już we wczesnym stadium. Optymalna strategia badań przesiewowych wśród tych osób nie jest ustalona. Pomocne zatem byłoby ustalenie markerów choroby, które pojawiają się jako pierwsze w jej przebiegu, ponieważ mogłoby to pozwolić na optymalizację badań przesiewowych. Również w tym kontekście nie oceniano dotychczas przydatności biomarkerów sercowych.

Cele badawcze

1. Weryfikacja częstości występowania wariantów skracających *TTN* jako czynników etiologicznych DCM oraz ocena ich znaczenia klinicznego poprzez porównanie cech fenotypowych oraz rokowania probantów z obecnym wariantem skracającym *TTN* oraz bez niego *(publikacja nr 1 – 2017 r.).*

2. Charakterystyka kliniczna nosicieli mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie DCM z uwzględnieniem stężeń biomarkerów sercowych; przeanalizowanie historii naturalnej kardiomiopatii w celu identyfikacji jej wczesnych markerów

a) wśród nosicieli mutacji w LMNA (publikacja nr 2 – 2020 r.),

b) wśród nosicieli mutacji w TTN (publikacja nr 3 - 2022 r.).

3. Ocena wartości prognostycznej stężeń biomarkerów sercowych w przewidywaniu wystąpienia nagłego zgonu sercowego lub jego ekwiwalentów oraz porównanie jej z używanymi aktualnie wyznacznikami ryzyka

a) wśród nosicieli mutacji w LMNA (publikacja nr 2 – 2020 r.),

b) wśród nosicieli mutacji w TTN (publikacja nr 3 – 2022 r.).

Materiał i metodyka

Badane kohorty rekrutowała się spośród chorych z DCM oraz ich krewnych, diagnozowanych i leczonych w Ośrodku Badań Przesiewowych Dziedzicznych Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego Narodowego Instytutu Kardiologii w Warszawie w latach 2010-2020. Wszystkim probantom z DCM pod opieką Ośrodka oferowano badanie genetyczne, a następnie także ich krewnym zgodnie z zasadami badania kaskadowego rodzin. U większości probantów analizę DNA przeprowadzono metodą sekwencjonowania następnej generacji (NGS). U części probantów badania NGS nie wykonano, jeżeli wcześniej przy użyciu innych metod stwierdzono obecność patogennego wariantu w jednym z genów powiązanych z kardiomiopatiami. DNA krewnych badano na obecność mutacji zidentyfikowanych u probantów metodą sekwencjonowania Sangera.

Retrospektywnie przeanalizowano dokumentację medyczną pacjentów (probantów i krewnych), a w szczególności dane z pierwszej udokumentowanej wizyty w Instytucie, wcześniejszą dokumentację medyczną oraz dane z późniejszej obserwacji. Charakterystyka początkowa obejmowała informacje z wywiadu, badanie przedmiotowe, wyniki 12-odprowadzeniowego EKG, dwuwymiarowego badania echokardiograficznego, rejestracji EKG metodą Holtera oraz badań laboratoryjnych, w tym stężenia biomarkerów sercowych mierzonych w okresie stabilizacji klinicznej: wysokoczułej sercowej troponiny T (hsTnT) i N-końcowego fragmentu propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP). Odnotowywano pierwsze udokumentowane wystąpienie takich wykładników choroby jak: nieprawidłowości echokardiograficzne (dysfunkcja skurczowa lewej komory, rozstrzeń lewej komory), objawy HF, arytmie, zaburzenia przewodzenia i podwyższone stężenia biomarkerów sercowych i na tej podstawie przy użyciu metody Kaplana-Meiera obliczano penetracje poszczególnych objawów chorobowych, uznając za zdarzenie pierwsze udokumentowane wystąpienie określonej nieprawidłowości.

Celem oceny rokowania odnotowywano poważne zdarzenia sercowo-naczyniowe, a w szczególności wystąpienie: 1. schyłkowej niewydolności serca (esHF), rozumianej jako zgon z powodu niewydolności serca, przeszczepienie serca lub wszczepienie wspomagania lewokomorowego; 2. złośliwej arytmii komorowej (MVA), rozumianej jako nagły zgon sercowy lub jego ekwiwalenty: skuteczna resuscytacja z powodu nagłego zatrzymania krążenia, utrwalony, niestabilny hemodynamicznie częstoskurcz komorowy lub adekwatna interwencja ICD (stymulacja przeciwarytmiczna lub wyładowanie).

Wyniki

Publikacja nr 1: Titin Truncating Variants in Dilated Cardiomyopathy - Prevalence and Genotype-Phenotype Correlations. PLoS One. 2017 Jan 3;12(1):e0169007. doi: 10.1371/journal.pone.0169007. eCollection 2017. PMID: 28045975

W grupie 72 probantów z rozpoznaną DCM poddanych badaniu NGS w latach 2012-2014 zidentyfikowano 16 wariantów skracających gen *TTN* (*TTN*tv) u 17 probantów (24% wszystkich badanych, w tym 30% w postaci rodzinnej DCM, 18% w postaci sporadycznej DCM). W wyniku kaskadowego badania krewnych zidentyfikowano kolejnych 29 nosicieli *TTNtv*.

Probanci ze zidentyfikowanym *TTN*tv nie różnili się istotnie od pozostałych wiekiem ani płcią. Podobne w obu grupach były klasa czynnościowa NYHA, frakcja wyrzucania lewej komory (LVEF), częstość migotania przedsionków i odsetek osób ze wszczepionym ICD. Istotnie rzadziej obecne były zaburzenia przewodnictwa przedsionkowo-komorowego lub blok lewej odnogi pęczka Hisa (LBBB).

W ciągu średnio 5,3 lat obserwacji nie stwierdzono istotnych różnic w częstości wystąpienia esHF pomiędzy probantami z *TTN*tv i bez nich (29% vs 31%, p=0,91).

Wśród nosicieli *TTN*tv stwierdzono niepełną penetrację choroby, wyższą u mężczyzn niż u kobiet (p=0,004). Wśród nosicieli *TTN*tv w okresie obserwacji u 17% wystąpiła esHF, a rokowanie było istotnie gorsze u mężczyzn niż u kobiet (p=0,018).

Publikacja nr 2: Can Circulating Cardiac Biomarkers Be Helpful in the Assessment of *LMNA* Mutation Carriers? J Clin Med. 2020 May 12;9(5):1443. doi: 10.3390/jcm9051443. PMID: 32408651

W wyniku badania genetycznego pacjentów z DCM zidentyfikowano 18 różnych patogennych wariantów *LMNA* u 21 probantów. Następnie potwierdzono obecność mutacji w *LMNA* u kolejnych 32 osób wśród krewnych probantów.

W czasie oceny wyjściowej wśród probantów 18 osób miało postawione rozpoznanie DCM lub kardiomiopatii hipokinetycznej bez rozstrzeni, a 3 osoby – kardiomiopatii nieokreślonej. Pośród krewnych rozpoznanie DCM było postawione tylko u 4 osób, kardiomiopatii nieokreślonej u 18 osób, a u 10 osób nie stwierdzono istotnych nieprawidłowości w badaniach obrazowych i elektrokardiografii. Probanci byli o średnio 11 lat starsi (40 vs 29 lat, p=0,002) od krewnych i charakteryzowali się większym nasileniem objawów HF, większym zaawansowaniem dysfunkcji skurczowej lewej komory, zaburzeń przewodzenia i rytmu serca oraz wyższym stężeniem NT-proBNP. Blok przedsionkowo-komorowy był obecny u prawie połowy krewnych (44%), natomiast LBBB stwierdzono wyłącznie u probantów. W obu grupach często wykrywane było podwyższone stężenie hsTnT (67 vs 37%, p = 0,065) oraz NT-proBNP (82 vs 36%, p=0,003).

Penetracja nieprawidłowości kardiologicznych w przebiegu kardiolaminopatii była zależna od wieku. Najwcześniejszą nieprawidłowością było podwyższone stężenie hsTnT, obecne w drugiej i trzeciej dekadzie życia z częstością odpowiednio 12 i 27%, wyprzedzające wystąpienie bloku przedsionkowo-komorowego i HF (po 5% w drugiej i po 15% w trzeciej dekadzie życia) oraz MVA (odpowiednio 2 i 13%). W siódmej dekadzie życia penetracja wykładników kardiolaminopatii była niemal całkowita: u 98% pacjentów wystąpił blok przedsionkowo-komorowy, u 100% arytmie przedsionkowe, 90% miało objawy HF, u 92% podwyższone było stężenie hsTnT, a u 100% - NT-proBNP.

W czasie obserwacji o medianie 4,2 roku u 26% pacjentów (u 14/53 osób) rozwinęła się esHF: trzech z nich zmarło z powodu HF, a u jedenastu doszło do transplantacji serca. Wystąpił jeden nagły zgon sercowy, u jednego pacjenta doszło do nagłego zatrzymania krążenia ze skuteczną resuscytacją. 29% pacjentów ze wszczepionym ICD doświadczyło jego adekwatnego wyładowania (10/34 osób).

Jednoczynnikowe analizy zdarzeń MVA występujących podczas obserwacji nie wykazały istotnego statystycznie wpływu płci i rodzaju mutacji na ryzyko wystąpienia MVA, natomiast potwierdziły wpływ takich czynników ryzyka, jak obecność zaburzeń przewodzenia przedsionkowo-komorowego, nieutrwalonego częstoskurczu komorowego (nsVT) lub obniżonej LVEF, a ponadto silnie powiązane z występowaniem MVA było stężenie NT-proBNP ≥150 pg/ml i hsTnT ≥20 ng/l (HR > 13, $p \leq 0{,}02$ w obu przypadkach). W analizie wieloczynnikowej z selekcją wsteczną stężenie NT-proBNP ≥150 pg/ml było jedynym niezależnym czynnikiem wystąpienia MVA.

Publikacja nr 3: Titin-Related Dilated Cardiomyopathy: The Clinical Trajectory and the Role of Circulating Biomarkers in the Clinical Assessment. Diagnostics (Basel). 2022;12(1):13. doi: 10.3390/diagnostics12010013. PMID: 35054181

Badania genetyczne metodą NGS u pacjentów z DCM, które zaowocowały w 2017 r. publikacją nr 1, były kontynuowane w kolejnych latach. Łącznie w ich wyniku zidentyfikowano 41 wariantów skracających *TTN* u 46 probantów. Trzech spośród nich wykluczono z analizy ze względu na obecność patogennych wariantów w innych genach powiązanych z kardiomiopatiami. Następnie w wyniku badania krewnych zidentyfikowano kolejnych 65 nosicieli *TTN*tv.

Badana kohorta nosicieli *TTN*tv składała się z 70 pacjentów z rozpoznaną DCM, 13 osób z kardiomiopatią nieokreśloną oraz 25 zdrowych krewnych bez objawów kardiomiopatii. Pacjenci z DCM byli młodzi (średnia wieku 40 lat), większość stanowili mężczyźni (79%) z objawami łagodnej HF w czasie wyjściowej oceny (80% w klasie NYHA I/II), średnia LVEF wyniosła 36%, a mediana stężenia NT-proBNP 534 pg/ml. Arytmie przedsionkowe stwierdzono w 31%, a nsVT w 55%. Nie stwierdzono istotnej różnicy w wieku między nimi a ich krewnymi bez rozpoznanej DCM, co sugeruje niepełną penetrację, zwłaszcza u kobiet, które stanowiły większość (68%) w grupie bez DCM. Stężenie hsTnT było istotnie wyższe u pacjentów z DCM, ale utrzymywało się na niskim poziomie (mediana 6,7 vs <3,0 ng/l).

Penetracja nieprawidłowości kardiologicznych w przebiegu kardiotytynopatii była zależna od wieku. Najwcześniejszą nieprawidłowością była dysfunkcja lewej komory, zdefiniowana jako dysfunkcja skurczowa lub rozstrzeń lewej komory, wykrywana w drugiej, trzeciej i czwartej dekadzie życia odpowiednio u 8%, 26% i 47% nosicieli. Wyprzedzała ona o 5–10 lat pojawienie się objawów HF i wzrost stężenia NT-proBNP oraz wystąpienie ciężkiej (często odwracalnej) dysfunkcji skurczowej lewej komory (LVEF <35%) i arytmii komorowej. Arytmie przedsionkowe i zaburzenia przewodzenia pojawiały się późno w przebiegu kardiotytynopatii, a podwyższone stężenie hsTnT było wskaźnikiem schyłkowej fazy choroby.

Mediana obserwacji w grupie 108 nosicieli *TTN*tv wyniosła 5,2 roku. W tym czasie u 13 (12%) pacjentów rozwinęła się esHF: 5 pacjentów zmarło z powodu HF, a u 8 wykonano przeszczepienie serca. MVA wystąpiły również u 13 (12%) pacjentów, w większości składały się na nie adekwatne interwencje ICD, u jednej osoby doszło do nagłego zgonu, a u dwóch wystąpiło nagłe zatrzymanie krążenia przerwane resuscytacją krążeniowo-oddechową.

Jednoczynnikowe analizy nie wykazały istotnego statystycznie wpływu płci i wywiadu rodzinnego na wystąpienie MVA, natomiast wykazały wpływ następujących czynników: obecność arytmii przedsionkowych, nsVT, LBBB, powiększenie lewego przedsionka i obniżenie LVEF. Silnie powiązane z występowaniem MVA było stężenie NT-proBNP, natomiast stężenie hsTnT nie miało istotnego wpływu. W analizie wieloczynnikowej stężenie NT-proBNP ≥650 pg/ml było najlepszym predyktorem MVA w okresie 6 lat obserwacji i przewyższało takie czynniki ryzyka jak obniżona LVEF, LBBB czy nsVT.

Podsumowanie

1. Warianty skracające *TTN* są ważną przyczyną dziedzicznej DCM, stwierdzoną u prawie jednej czwartej chorych z DCM diagnozowanych i leczonych w Ośrodku Badań Przesiewowych NIK w Warszawie. Pacjenci z DCM na podłożu *TTN*tv nie wykazują istotnych różnić fenotypowych w porównaniu z pozostałymi pacjentami z DCM poza niską częstością zaburzeń przewodzenia przedsionkowo-komorowego i wewnątrzkomorowego. Obecność *TTN*tv u chorych z DCM nie podnosi ryzyka progresji do esHF.

2a. Kardiolaminopatie charakteryzują się występowaniem zaburzeń rytmu i przewodzenia, poprzedzającym pojawienie się dysfunkcji skurczowej lewej komory i objawów HF. Często już we wczesnym stadium choroby wykrywane jest podwyższone stężenie hsTnT oraz NT-proBNP. Penetracja nieprawidłowości kardiologicznych w przebiegu kardiolaminopatii była zależna od wieku, a najwcześniejszą nieprawidłowością było podwyższone stężenie hsTnT, wyprzedzające wystąpienie bloku przedsionkowo-komorowego, arytmii komorowej i HF. Ocena biomarkerów sercowych może być zatem przydatna w wykrywaniu kardiolaminopatii.

2b. W przebiegu kardiotytynopatii najwcześniej wykrywane nieprawidłowości dotyczą wymiarów i funkcji lewej komory, które wyprzedzają objawy HF, wzrost stężenia NT-proBNP oraz wystąpienie arytmii komorowej. Arytmie przedsionkowe i zaburzenia przewodzenia pojawiały się późno w przebiegu kardiotytynopatii, a stężenie hsTnT nie jest podwyższone we wczesnej, lecz dopiero w schyłkowej fazie choroby. Pomiary stężeń biomarkerów sercowych nie mogą zatem zastąpić echokardiografii w celu wykrycia wczesnej fazy choroby u bezobjawowych nosicieli *TTN*tv.

3. Podwyższone stężenie NT-proBNP było najsilniejszym czynnikiem ryzyka wystąpienia złośliwej arytmii komorowej w DCM związanej zarówno z *TTN*tv, jak i mutacjami w *LMNA,* i przewyższało takie czynniki ryzyka jak obniżona LVEF czy nsVT.

10.06.2022 Przemysław Ciemiellewski