

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie nauk medycznych  
i nauk o zdrowiu

**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

<b>Spis treści.</b>	strona
1. Wykaz osiągnięć naukowych .....	3
2. Wykaz stosowanych skrótów .....	6
3. Wprowadzenie .....	8
4. Cele badawcze .....	14
5. Materiał i metodyka .....	15
6. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach .....	20
7. Dyskusja .....	28
8. Streszczenie w języku polskim .....	34
9. Streszczenie w języku angielskim .....	42
10. Piśmiennictwo .....	50
11. Opublikowane artykuły naukowe stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej wraz z materiałami dodatkowymi .....	57
12. Kopie oświadczeń współautorów publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej	

## 1. Wykaz osiągnięć naukowych

### 1.1. 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., Sobieszczęńska-Matek 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., Sobieszczęńska-Matek 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., Sobieszczęńska-Matek 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

## 1.2. Inne publikacje powiązane z tematem rozprawy doktorskiej.

1. A study in Polish patients with cardiomyopathy emphasizes pathogenicity of phospholamban (PLN) mutations at amino acid position 9 and low penetrance of heterozygous null PLN mutations.

Truszkowska G.T., Bilińska Z.T., Kosińska J., Śleszycka J., Rydzanicz M., Sobieszcańska-Matek M., Franaszczyk M., Bilińska M., Stawiński P., Michalak E., Matek Ł.A., Chmielewski P., Foss-Nieradko B., Machnicki M.M., Stokłosa T., Ponińska J., Szumowski Ł., Grzybowski J., Piwoński J., Drygas W., Zieliński T., Płoski R.

BMC Medical Genetics. 2015 Apr 3;16:21. doi: 10.1186/s12881-015-0167-0. PMID: 25928149  
IF 2,094

2. Analysis of De Novo Mutations in Sporadic Cardiomyopathies Emphasizes Their Clinical Relevance and Points to Novel Candidate Genes.

Franaszczyk M., Truszkowska G., Chmielewski P., Rydzanicz M., Kosińska J., Rywik T., Biernacka A., Śpiewak M., Kostrzewa G., Stępień-Wojno M., Stawiński P., Bilińska M., Krajewski P., Zieliński T., Lutyńska A., Bilińska Z.T., Płoski R.

Journal of Clinical Medicine. 2020 Jan 29;9(2):370. doi: 10.3390/jcm9020370. PMID: 32013205  
IF 5,688

3. A Novel *DSP* Truncating Variant in a Family with Episodic Myocardial Injury in the Course of Arrhythmogenic Cardiomyopathy - A Possible Role of a Low Penetrance *NLRP3* Variant.

Chmielewski P., Truszkowska G.T., Kukla P., Zakrzewska-Koperska J., Śpiewak M., Stępień-Wojno M., Bilińska M., Lutyńska A., Płoski R., Bilińska Z.T.

Diagnostics (Basel). 2020 Nov 16;10(11):955. doi: 10.3390/diagnostics10110955. PMID: 33207704  
IF 3,706

4. A novel risk model for predicting potentially life-threatening arrhythmias in non-ischemic dilated cardiomyopathy (DCM-SVA risk).

Kayvanpour E., Sammani A., Sedaghat-Hamedani F., Lehmann D.H., Broezel A., Koelmenoglu J., Chmielewski P., Curjol A., Socie P., Miersch T., Haas J., Gi W.T., Richard P., Płoski R., Truszkowska G., Baas A.F., Foss-Nieradko B., Michalak E., Stępień-Wojno M., Zakrzewska-Koperska J., Śpiewak M., Zieliński T., Villard E., Te Riele A.S.J.M., Katus H.A., Frey N., Bilińska Z.T., Charron P., Asselbergs F.W., Meder B.

International Journal of Cardiology. 2021 Sep 15;339:75-82. doi: 10.1016/j.ijcard.2021.07.002. Epub 2021 Jul 7. PMID: 34245791

IF 4,164

## 2. Wykaz stosowanych skrótów

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
AVB	blok przedsionkowo-komorowy (atrio-ventricular block)
AF	migotanie przedsionków (atrial fibrillation)
<i>BAG3</i>	gen atanogenu typu 3 związanego z białkami Bcl2 (Bcl2-associated athanogene 3)
DCM	kardiomiopatia rozstrzeniowa (dilated cardiomyopathy)
<i>DES</i>	gen desminy
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid)
<i>DSP</i>	gen desmoplakiny
EKG	elektrokardiogram
esHF	schyłkowa niewydolność serca (end-stage heart failure)
<i>FLNC</i>	gen filaminy C
HF	niewydolność serca (heart failure)
HNDC	kardiomiopatia hipokinetyczna bez rozstrzeni (hipokinetic non-dilated cardiomyopathy)
HR	współczynnik hazardu (hazard ratio)
hsTnT	wysokoczuła sercowa troponina T (high-sensitivity cardiac troponin T)
HTx	przeszczepienie serca (heart transplantation)
ICD	wszczepialny kardiowerter-defibrylator (implantable cardioverter defibrillator)
LBBB	blok lewej odnogi pęczka Hisa (left bundle branch block)
LK	lewa komora
<i>LMNA</i>	gen laminy A/C
LVAD	urządzenie wspomagające lewą komorę (left ventricular assist device)
LVEF	frakcja wyrzutowa lewej komory (left ventricular ejection fraction)
MLPA	zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (multiplex ligation-dependent probe amplification)

MVA	złośliwa arytmia komorowa (malignant ventricular arrhythmia)
<i>MYH7</i>	gen łańcucha ciężkiego miozyny typu 7 (myosin heavy chain 7)
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji (next generation sequencing)
nsVT	nieutrwalony częstoskurcz komorowy (nonsustained ventricular tachycardia)
NT-proBNP	N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide)
NYHA	New York Heart Association
<i>PLN</i>	gen fosfolambanu
SCA	nagłe zatrzymanie krążenia (sudden cardiac arrest)
SCD	nagły zgon sercowy (sudden cardiac death)
<i>SCN5A</i>	gen podjednostki $\alpha$ bramkowanego napięciem kanału sodowego typu 5
SD	odchylenie standardowe (standard deviation)
<i>TTN</i>	gen tytyny
<i>TTNtv</i>	wariant skracający genu tytyny

### 3. Wprowadzenie

Dokonany w ostatnich dziesięcioleciach postęp medycyny umożliwia coraz skuteczniejsze diagnozowanie i leczenie wielu jednostek chorobowych. Niemniej wyniki leczenia w wielu przypadkach są nadal niezadowalające, a ryzyko powikłań pozostaje wysokie. W części przypadków brak optymalnej odpowiedzi na leczenie może wynikać z uwarunkowań genetycznych, które definiują zarówno mechanizmy powstawania choroby, jak i działania leków. W oparciu o tę hipotezę rozwija się nowa gałąź medycyny, tzw. medycyna spersonalizowana (personalized medicine), wg postulatów której dla optymalnego efektu klinicznego konieczne może być uwzględnienie profilu genetycznego pacjenta.

Kardiomiopatia rozstrzeniowa (DCM) to jednostka chorobowa charakteryzująca się rozstrzenią i upośledzeniem kurczliwości lewej komory (LK) lub obu komór, które nie są spowodowane chorobą wieńcową (o nasileniu adekwatnym do dysfunkcji skurczowej) ani nadmiernym obciążeniem serca (np. w wyniku źle kontrolowanego nadciśnienia tętniczego czy istotnych wad zastawkowych) [1]. DCM jest chorobą o dużym znaczeniu społecznym, ponieważ często dotyczy osób młodych, ograniczając ich aktywność zawodową i rodzinną. Może ona prowadzić do takich następstw klinicznych jak nagły zgon sercowy (30% zgonów z powodu DCM) czy schyłkowa niewydolność serca (70%) [2]. W rejestrze International Society for Heart and Lung Transplantation DCM jest najczęstszą przyczyną przeszczepienia serca [3]. Częstość występowania DCM w populacji ogólnej jest oceniana na 1:250 – 1:2500 osób [4-6], a w badaniu Global Burden of Disease z 2015 r. stwierdzono występowanie kardiomiopatii u 2,5 miliona osób, co stanowi wzrost o 27% w ciągu 10 lat [7].

Etiologia DCM jest zróżnicowana, wśród jej przyczyn wymienia się m.in. czynniki infekcyjne, zapalne, autoimmunologiczne, toksyczne, endokrynologiczne czy niedobory żywieniowe [1]. Aktualnie jednak wiadomo, że podobnie jak w innych rodzajach kardiomiopatii najważniejszą rolę odgrywają czynniki genetyczne. DCM ma dziedziczne podłoże u około 40% chorych [4, 8, 9]. Co zrozumiacie, jest ono dominujące w rodzinnej DCM, stanowiącej ok. 20-50% przypadków [4, 10]. Warto podkreślić, że obecność patogennych wariantów genetycznych stwierdzana jest często również w DCM sporadycznej [11].

Początkowo jako miarę istotnego upośledzenia kurczliwości LK przyjęto jej frakcję wyrzutową (LVEF) <45% [1]. Niedawno w stanowisku grupy roboczej Europejskiego



Towarzystwa Kardiologicznego zaproponowano rozszerzenie spektrum choroby [12], a mianowicie jako kryterium rozpoznania DCM u pacjentów z rozstrzenią LK dopuszczono każde zmniejszenie LVEF, wyodrębniono ponadto kardiomiopatię hipokinetyczną bez rozstrzeni (HNDC - hipokinetic non-dilated cardiomyopathy), rozpoznawaną u pacjentów z prawidłową wielkością LK i LVEF obniżoną do <45%. W dokumencie tym podkreślono istnienie przedklinicznej fazy choroby, obejmującej m. in. izolowaną rozstrzeń LK oraz obecność zaburzeń rytmu lub przewodzenia bez uchwytnych nieprawidłowości w badaniach obrazowych [12]. W przypadku krewnych pacjentów z DCM zaproponowano zmodyfikowane kryteria diagnostyczne. Dla pewnego rozpoznania DCM nadal konieczne jest wypełnienie takich samych kryteriów jak w przypadkach sporadycznych, ale rozpoznanie DCM jest prawdopodobne lub możliwe także w obecności nieprawidłowości charakterystycznych dla przedklinicznej fazy schorzenia, takich jak istotna rozstrzeń LK, zaburzenia przewodnictwa, przedsionkowe lub komorowe zaburzenia rytmu serca [12].

Przełom w ocenie znaczenia podłoża genetycznego umożliwiła rozwijana od lat 90-tych XX wieku technologia sekwencjonowania następnej generacji (NGS), która pozwala na równoczesne badanie wielu genów (w tym genów dużych), a nawet całego eksomu czy genomu. Ułatwia to wykrywanie chorobotwórczych mutacji oraz badanie korelacji genotypowo-fenotypowych.

Dotychczas zidentyfikowano ponad 50 genów, których mutacje mogą być przyczyną DCM [13]. Autorzy niedawno opublikowanej analizy dowody na przyczynowy związek z rozwojem DCM w przypadku 12 genów uznali za silne, w przypadku 7 genów za umiarkowanie silne, a w pozostałych przypadkach przesłanki te mają znaczne ograniczenia [13]. Zwraca uwagę zróżnicowanie genów leżących u podłoża DCM kodujących białka należące do różnych kompartmentów komórkowych kardiomiocyta: tylko w grupie genów o pewnym związku z DCM są geny kodujące białka sarkomerowe (*TTN*, *MYH7*), szkieletu komórkowego (*DES*, *FLNC*), jądra komórkowego (*LMNA*), kanałów jonowych (*SCN5A*), desmosomalne (*DSP*) i inne (*BAG3*, *PLN*).

Patogeny charakter mogą mieć warianty genetyczne różnego rodzaju. Warianty zmiany sensu (missensowne) prowadzą do zamiany pojedynczego aminokwasu w syntetyzowanym białku; delecje skutkują utratą, a insercje syntezą dodatkowego fragmentu

łańcucha białkowego. Warianty skracające prowadzą do przedwczesnego zakończenia syntezy łańcucha białkowego; taki efekt wywierają warianty nonsensowne (stop), warianty zmiany ramki odczytu (frameshift) oraz nieprawidłowego składania genu (splicingowe).

Przewidywanie patogenności wariantów genetycznych może nastroić trudności, zwł. w przypadku wariantów nowych. W dużych genach, np. genie tytyny (*TTN*) czy filaminy C (*FLNC*), za patogenne uważa się przede wszystkim warianty skracające; warianty zmiany sensu są w nich identyfikowane bardzo często również u osób zdrowych i przewidywanie ich patogenności jest bardzo trudne [14]. Klasyfikację wariantów genetycznych ułatwiają opublikowane w 2015 r. wytyczne American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) [15], dzielące je na 5 kategorii: patogenne, prawdopodobnie patogenne, o niejasnym znaczeniu klinicznym oraz łagodne i prawdopodobnie łagodne. Warianty patogenne i prawdopodobnie patogenne traktowałem w tekście rozprawy łącznie jako patogenne i posługiwałem się w ich przypadku zamiennie terminem mutacja.

Uwarunkowana genetycznie DCM w większości przypadków dziedziczy się w sposób autosomalny dominujący i charakteryzuje się niepełną, zależną od wieku penetracją. Rzadziej stwierdza się inne klasyczne modele dziedziczenia: w sposób autosomalny recesywny przekazywana jest np. DCM związana z mutacjami genu fukutyny, w sposób sprzężony z chromosomem X - kardiomiopatia związana z dystrofią mięśniową Duchenne'a i Beckera. DCM może być też wynikiem dziedziczenia mitochondrialnego. Ostatnio podnosi się ponadto, że aż 20-30% DCM może mieć podłoże oligogenowe, znacznie trudniejsze do zdefiniowania [16].

W ostatnich latach dokonuje się ogromny postęp wiedzy dotyczący korelacji genotypowo-fenotypowych w DCM. Są to doniesienia o dużym znaczeniu, ponieważ pozwalają na dostrzeżenie istotnych różnic w przebiegu choroby w zależności od podłoża genetycznego. Historia naturalna tych rzadkich chorób jest jednak nadal niedostatecznie poznana, co utrudnia podejmowanie decyzji klinicznych. Aktualne zasady terapii DCM uwarunkowanej genetycznie nie odbiegają zasadniczo od leczenia innych postaci HF z obniżoną LVEF. Wyjątkiem jest zalecenie rozważenia wcześniejszej implantacji kardiowertera-defibrylatora (ICD) w prewencji pierwotnej nagłego zgonu sercowego (SCD) w

kardiomiopatii na podłożu mutacji w *LMNA* i niektórych innych genach związanych z arytmogennym fenotypem [17, 18].

Dotychczas najlepiej scharakteryzowana została DCM na podłożu tytynopatii [19-25] oraz laminopatii [26-35], a więc dwie najczęstsze postaci genetycznie uwarunkowanej DCM.

Gen *LMNA*, kodujący białko jądrowe laminę, był pierwszym genem powiązany z rozwojem uwarunkowanej genetycznie, dziedziczonej w sposób autosomalny dominujący DCM. Zależność tę opisano po raz pierwszy w 1999 r. [36] Lamininy są białkami filamentów pośrednich typu V, pełniącymi w jądrze komórkowym funkcje strukturalne i regulacyjne [30]. Podtrzymują one chromatynę i biorą udział w regulacji ekspresji genów. Oddziałują także z błoną jądrową, uczestnicząc w utrzymaniu integralności jądra komórkowego. Mutacje w *LMNA* mogą zatem skutkować niestabilnością błony jądrowej i dezorganizacją chromatyny, a nawet dezintegracją jądra komórkowego i apoptozą. Mogą też powodować epigenetyczne zmiany chromatyny, wpływające na regulację ekspresji genów. Niekiedy agregaty zmutowanej prelaminy mają wpływ toksyczny na komórki mięśnia sercowego [37]. Zlokalizowane w *LMNA* mutacje odpowiadają za ok. 6% przypadków DCM [38].

Kardiomiopatia uwarunkowana mutacjami w *LMNA* wyróżnia się odmiennym od większości przypadków DCM arytmogennym fenotypem oraz niekorzystnym rokowaniem [28, 31, 39]. Charakteryzuje się szybką progresją choroby i dużą częstością poważnych zdarzeń niepożądanych, zarówno arytmicznych, jak i związanych z niewydolnością serca (HF), prowadzących do jej schyłkowej postaci. W przebiegu kardiolaminopatii zwykle wcześniej stwierdza się wystąpienie bloku przedsionkowo-komorowego (AVB) i nadkomorowych zaburzeń rytmu serca, wyprzedzających pojawienie się dysfunkcji skurczowej LK oraz arytmii komorowej, a następnie objawów HF [31].

W 2002 r. wykazano po raz pierwszy, że DCM może być również uwarunkowana mutacjami w genie *TTN* [40], który zawiera aż 363 eksony i koduje białko mięśni poprzecznie prążkowanych tytynę. Jest ona największym znanym białkiem kręgowców, zbudowanym z 27-33 tysięcy reszt aminokwasowych, stanowiącym składnik podporowy sarkomeru [41]. Rozciąga się ona przez połowę jego długości, kotwicząc się końcem karboksylowym w linii M, a końcem aminowym w linii Z. W jej budowie wyróżniamy następujące domeny: prążki M, A, I oraz dysk Z, przebiegające przez analogiczne części sarkomeru. Prążek A tworzy

nierozciągliwa domena, wiążąca się sztywno z filamentem miozynowym, natomiast prążek I odpowiada za elastyczność tytyny i całego sarkomeru [41]. Za patogenne uważa się niemal wyłącznie mutacje skracające *TTN* (*TTNtv*); mutacje zmiany sensu są stwierdzane bardzo często i przewidywanie ich patogenności jest bardzo trudne [14].

Aktualnie wiadomo, że *TTNtv* są najczęstszą genetyczną przyczyną DCM, identyfikowaną w ok. 20% przypadków [38]. Odkrycie to stało się możliwe dzięki wdrożeniu pod koniec pierwszej dekady XXI wieku sekwencjonowania następnej generacji (NGS), co ułatwiło wykrywanie mutacji w dużych genach, takich jak *TTN* [42]. W 2012 r. ukazała się pierwsza praca oceniająca częstość występowania *TTNtv* u chorych z DCM [19]. Chociaż aktualnie ich rola jako przyczyny DCM nie budzi wątpliwości, początkowo była ona kwestionowana, zwłaszcza że warianty te są stwierdzane z dużą częstością (3%) w populacji ogólnej. W opublikowanym w 2015 r. europejskim atlasie dziedzicznego podłoża DCM *TTNtv* nie były najczęstsze [43]. Ich rola jako przyczyny DCM wymagała potwierdzenia, konieczne były również badania dotyczące powiązań genotypowo-fenotypowych.

Warianty skracające *TTN* są stwierdzane zarówno w DCM rodzinnej [39], jak i sporadycznej [11], mogą leżeć u podłoża takich postaci DCM jak kardiomiopatia połogowa, alkoholowa czy wywołana chemioterapią [44-46]. Wykazano, że rokowanie w kardiomyopatii jest podobne jak w innych postaciach DCM [11, 19, 20]. Często stwierdza się dobrą odpowiedź na zastosowane leczenie [21, 23, 47], a wpływ na przebieg choroby przypisywano lokalizacji mutacji w obrębie genu [19, 48]. Zagrożenie zaburzeniami rytmu serca nie zostało dobrze określone, ale wykazano, że obecność *TTNtv* stanowi czynnik ryzyka utrwalonej arytmii komorowej w populacji pacjentów z DCM i wszczepionym ICD [22, 49].

Choć kardiomiopatie uwarunkowane mutacjami w *TTN* i *LMNA* należą do najlepiej scharakteryzowanych fenotypowo, w dotychczasowych opracowaniach nie oceniano przydatności diagnostycznej oraz rokowniczej biomarkerów. N-końcowy fragment propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP) i wysokoczuła sercowa troponina T (hsTnT) są biomarkerami sercowymi, do których zalet należy powszechna dostępność, niski koszt i łatwość w interpretacji.

Duże znaczenie w opiece nad chorymi z DCM ma ocena ryzyka zgonu, zwłaszcza zgonu nagłego. W kwalifikacji do implantacji ICD w prewencji pierwotnej SCD niezależnie od

etiologii HF zastosowanie mają kryteria oparte przede wszystkim o ocenę LVEF [18]. Przydatność oznaczania biomarkerów dla oceny rokowania stwierdzano już u pacjentów z HF i obniżoną LVEF (bez rozróżniania etiologii). Wykazano, że podwyższone stężenie hsTnT jest czynnikiem ryzyka śmiertelności ogólnej, sercowo-naczyniowej lub zgonu i hospitalizacji z powodu HF [50, 51], a peptydu natriuretycznego typu B i NT-proBNP - SCD i zagrażającej życiu arytmii komorowej [52-54].

Podkreślić należy, że w dotychczasowych pracach dotyczących DCM jako wskaźniki ryzyka arytmicznego oceniano przede wszystkim parametry elektrokardiograficzne lub z badań obrazowych, takie jak blok lewej odnogi pęczka Hisa (LBBB), obecność nieutrwalonego częstoskurczu komorowego (nsVT) w 24-godzinnej rejestracji EKG metodą Holtera, obniżona LVEF lub obecność późnego wzmocnienia kontrastowego w badaniu rezonansu magnetycznego [55, 56]. Dla oceny groźnej arytmii komorowej wśród pacjentów z DCM i jej poszczególnymi podtypami nie była natomiast badana przydatność oznaczania biomarkerów. Stężenie NT-proBNP zostało uwzględnione w niedawno opracowanym kalkulatorze ryzyka zgonu z dowolnej przyczyny w DCM [57].

Zidentyfikowanie mutacji odpowiadającej za rozwój DCM u probanta umożliwia poszukiwanie 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 [58]. Pomocne zatem byłoby ustalenie markerów choroby, które pojawiają się jako pierwsze w jej przebiegu. Również w tym kontekście nie oceniano dotychczas przydatności biomarkerów sercowych. Chociaż ich znaczenie w wykrywaniu HF jest ustalone [59] i są one stosowane w diagnostyce utajonej DCM u psów [60], to mało wiadomo na temat ich roli w przedklinicznej fazie DCM u ludzi [61].

#### **4. 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.).*

## 5. Materiał i metodyka

### 5.1. Materiał

Badane kohorty rekrutowały się spośród chorych z DCM oraz ich krewnych, diagnozowanych i leczonych w Ośrodku Badań Przesiewowych Dziedzicznych Chorób Układu Sercowo-Naczyniowego Narodowego Instytutu Kardjologii w Warszawie w latach 2010-2020.

Kohorta do publikacji nr 1 obejmowała 72 niespokrewnionych probantów z DCM skierowanych do Ośrodka w latach 2012-2014 w celu diagnostyki genetycznej oraz ich 29 krewnych, u których stwierdzono nosicielstwo wariantu skracającego *TTN*.

Kohorta do publikacji nr 2 obejmowała 21 niespokrewnionych probantów z DCM, HNDC lub kardiomiopatią nieokreśloną na podłożu mutacji w *LMNA* oraz ich 32 krewnych, u których również stwierdzono nosicielstwo wariantu w *LMNA*.

Kohorta do publikacji nr 3 obejmowała 43 niespokrewnionych probantów z DCM na podłożu mutacji skracających w *TTN* oraz ich 65 krewnych, u których również stwierdzono nosicielstwo *TTN*tv.

### 5.2. Badanie genetyczne

Wszystkim probantom z DCM pod opieką Ośrodka oferowano badanie genetyczne, a następnie także ich krewnym zgodnie z zasadami badania kaskadowego rodzin. Zidentyfikowane warianty były klasyfikowane zgodnie z kryteriami ACMG [15, 62].

DNA do badań genetycznych zostało uzyskane z próbek krwi obwodowej przez ekstrakcję fenolem, izolację metodą wysalania lub przy użyciu komercyjnego zestawu do izolacji genomowego DNA Genomic Maxi AX firmy A&A Biotechnology.

U większości probantów analizę DNA przeprowadzono metodą NGS. Badania NGS nie wykonywano, jeżeli obecność patogennego wariantu stwierdzono wcześniej poprzez bezpośrednie sekwencjonowanie metodą Sangera lub metodą zależnej od ligacji multipleksowej amplifikacji sond (MLPA) w jednym z genów powiązanych z kardiomiopatiami. Dotyczy to 16 probantów z DCM na podłożu laminopatii, u których

zbadano wyłącznie dwanaście eksonów *LMNA* i ich intronowe regiony flankujące, a ponadto 7 probantów z mutacjami zidentyfikowanymi w genach *PLN* i *BAG3*.

DNA krewnych badano na obecność wariantów zidentyfikowanych u probantów metodą Sangera.

Badanie NGS obejmowało różną liczbę genów: od zestawu 35 genów powiązanych z kardiomiopatiami zaprojektowanego na zamówienie przy użyciu odczynników SeqCap EZ Choice Library firmy Roche Nimblegen, poprzez komercyjny zestaw TruSight Cardio Sequencing Kit (TSC) firmy Illumina (174 geny) oraz zestaw TruSight One (TSO) firmy Illumina (>4800 genów powiązanych z fenotypami klinicznymi) aż do sekwencjonowania całoeksomowego przy użyciu odczynników: TruSeq Exome Enrichment Kit (Illumina), Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina) lub Twist Human Core Exome Kit (Twist Bioscience). Panel TSC zsekwencjonowano przy użyciu urządzenia MiSeq Dx, zaś panel 35 genów, TSO oraz WES przy użyciu HiSeq1500 lub NovaSeq6000.

Sekwencjonowanie metodą Sangera przeprowadzono przy użyciu odczynników BigDye Terminator v3.1/v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies) przy użyciu sekwenatora Genetic Analyzer 3500xL lub Genetic Analyzer 3130xL (Life Technologies), a jego wyniki analizowano przy pomocy oprogramowania Variant Reporter 1.1.

Badania genetyczne były wykonywane w ramach grantu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju ERA-CVD DETECTIN-HF/2/2017, wcześniejszych grantów: 0010/P05B/98/14 z Komitetu Badań Naukowych, 2011/01/B/NZ4/03455 z Narodowego Centrum Nauki oraz prac statutowych z Narodowego Instytutu Kardiologii (2.57/VII/03, 2.18/II/08, 2.56/II/14). Wszystkie te projekty otrzymały zgodę Komisji Bioetycznej Instytutu Kardiologii.

### **5.3. Dane kliniczne**

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: wysokoczułej sercowej troponiny T (hsTnT) i N-końcowego fragmentu propeptydu natriuretycznego typu B (NT-proBNP).

Stężenia biomarkerów mierzono w okresie stabilizacji klinicznej, czyli co najmniej 3 miesiące od ostatniego zaostrzenia HF. W przypadku pacjentów, których pierwszy kontakt z Instytutem miał miejsce w czasie zaostrzeń HF, ocenę wyjściową przenoszono na późniejsze wizyty ambulatoryjne. Stężenia biomarkerów oznaczane w trakcie zaostrzeń HF nie były uwzględniane w analizie.

Odnotowywano pierwsze udokumentowane wystąpienie takich wykładników (markerów) kardiomiopatii jak: dysfunkcja skurczowa LK, rozstrzeń LK, objawy HF, arytmie przedsionkowe, nsVT, liczne pobudzenia dodatkowe komorowe, AVB dowolnego stopnia (za wyjątkiem periodyki Wenckebacha), LBBB i podwyższone stężenia biomarkerów sercowych.

Za kryterium dysfunkcji skurczowej LK przyjęto obniżenie LVEF poniżej 50%, a jej rozstrzeni - wzrost wymiaru LK korygowanego względem wieku i powierzchni ciała przy pomocy równania Henry'ego powyżej 117% wartości należnej w przypadku publikacji nr 1 oraz 112% w publikacji nr 2 i 3. Arytmie przedsionkowe zdefiniowano jako migotanie (AF) i trzepotanie przedsionków lub częstoskurcze przedsionkowe trwające powyżej 30 sek., nsVT jako co najmniej 3 kolejne pobudzenia komorowe o częstości >120/min. trwające <30 sek., a liczne pobudzenia dodatkowe komorowe jako przekraczające 500 / 24 godziny. Stężenia biomarkerów uważano za podwyższone, jeśli przekraczały górną granicę normy wg wskazań producenta odczynników (14 ng/l dla hsTnT i 125 pg/ml dla NT-proBNP).

Przy współistnieniu rozstrzeni i dysfunkcji skurczowej LK stawiano rozpoznanie DCM, w przypadku LVEF <45% przy prawidłowej wielkości LK – rozpoznanie HNDC, zaś w przypadku stwierdzenia innych istotnych nieprawidłowości, takich jak izolowana rozstrzeń LK, LVEF 45–49% bez rozstrzeni LK czy zdefiniowane powyżej zaburzenia przewodnictwa i rytmu serca, używałem terminu kardiomiopatia nieokreślona (tożsamego z użytym w publikacji nr 1 rozpoznaniem prawdopodobnej lub możliwej DCM wg kryteriów rozpoznawania DCM u krewnych [12]).

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

Z analiz ryzyka wystąpienia MVA wyłączono pacjentów, u których już w okresie przed oceną wstępną doszło do ich wystąpienia.

#### **5.4. Statystyka**

Jeżeli nie określono inaczej, wyniki zmiennych jakościowych zostały przedstawione jako częstości absolutne (zliczenia) i względne (procenty) jednostek wyróżnionych, a wyniki zmiennych ciągłych w zależności od rozkładu jako wartości średnie arytmetyczne z odchyleniem standardowym (SD) lub mediany z kwartylem dolnym (25 percentyl) i górnym (75 percentyl). Ocenę normalności rozkładów przeprowadzono sprawdzianem Shapiro-Wilka.

Do porównania proporcji zastosowano test zgodności chi-kwadrat lub dokładny test Fishera (w przypadku oczekiwanej liczby obserwacji w komórkach tabeli wielodzzielczej mniejszej od 5). Istotność różnic między wartościami średnimi zmiennych ciągłych weryfikowano testem t-Studenta w przypadku danych o rozkładzie normalnym lub nieparametrycznym testem Manna–Whitneya analizując dystrybucję rang w przypadku rozkładu skośnego.

Penetracje poszczególnych markerów kardiomiopatii obliczono metodą Kaplana-Meiera, w której za zdarzenie uznawano pierwsze udokumentowane wystąpienie określonej nieprawidłowości.

Krzywe przeżycia dla wybranych zdarzeń estymowano metodą Kaplana-Meiera, a jednorodność krzywych 2 populacji weryfikowano testem log-rank.

Wpływ niezależnych zmiennych na czas wystąpienia pierwszego zdarzenia oceniano wieloczynnikowym regresyjnym modelem proporcjonalnych hazardów Coxa. Zastosowano metodę wstecznej selekcji zmiennych, w której wyjściowy model stanowiły zmienne, dla których wykazano istotność statystyczną na poziomie  $p < 0,1$  w wynikach analiz jednoczynnikowych. Współczynniki hazardu (HR) obliczono wraz z 95% przedziałem ufności. W przypadku zerowych zdarzeń w jednej z podgrup, HR obliczono uwzględniając poprawkę Firtha. Założenie stałych hazardów zweryfikowano statystyką opartą na ważonych resztach Schoenfelda. Dopasowanie modeli oceniono wskaźnikiem C Harrella. W przypadku zmiennych ciągłych zastosowano analizę krzywej oceny jakości klasyfikatora (ROC) do wyznaczenia optymalnego punktu odcięcia w przewidywaniu analizowanych zdarzeń. Kryterium wyboru punktu stanowiła maksymalna wartość indeksu Youdena.

Wszystkie testy były dwustronne z prawdopodobieństwem popełnienia błędu I rodzaju mniejszym 0,05. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego SAS w wersji 9.4 lub STATISTICA v13.

## 6. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej.

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

Franaszczyk M., Chmielewski P., Truszkowska G., Stawiński P., Michalak E., Rydzanicz M., Sobieszcańska-Matek 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

W grupie 72 probantów z rozpoznaną DCM przeprowadzono badanie genetyczne metodą NGS w latach 2012-2014. Zidentyfikowano 16 różnych *TTN*tv u 17 probantów (24% wszystkich badanych, w tym 30% w postaci rodzinnej DCM, 18% w postaci sporadycznej). W wyniku kaskadowego badania krewnych zidentyfikowano kolejnych 29 nosicieli *TTN*tv. Spośród zidentyfikowanych *TTN*tv 13 było nowych i aż 14 zlokalizowanych w prążku A; 10 spośród nich to mutacje nonsensowne, a 6 typu zmiany ramki odczytu.

Probandzi ze zidentyfikowanym *TTN*tv nie różnili się istotnie od pozostałych wiekiem ( $33\pm 11$  vs  $34\pm 14$  lat,  $p=0,86$ ), płcią (mężczyźni stanowili 71% vs 66%,  $p=0,69$ ) ani częstością rodzinnej postaci kardiomiopatii (59% vs 42%,  $p=0,24$ ). Podobne w obu grupach były klasa czynnościowa NYHA ( $2,9\pm 0,8$  vs  $2,7\pm 1,0$ ,  $p=0,36$ ), LVEF ( $25\pm 9\%$  vs  $24\pm 10\%$ ,  $p=0,69$ ), częstość AF (35% vs 31%,  $p=0,73$ ) i odsetek osób ze wszczepionym ICD (41% vs 51%,  $p=0,58$ ). Istotnie rzadziej stwierdzane były zaburzenia przewodnictwa: AVB lub LBBB (6% vs 38%,  $p=0,01$ ).

W ciągu obserwacji trwającej średnio 5,3 lat doszło do wystąpienia esHF u 5 (29%) probantów *TTN*tv(+) i 17 (31%) probantów *TTN*tv(-). W analizie Kaplana-Meiera nie stwierdzono, aby obecność *TTN*tv istotnie wpływała na ryzyko esHF ( $p=0,84$ ).

Kohorta nosicieli *TTN*tv (probandów i krewnych) składała się z 26 pacjentów z rozpoznaną DCM, 11 zdrowych krewnych bez objawów kardiomiopatii oraz 9 osób z kardiomiopatią nieokreśloną (czyli prawdopodobną lub możliwą DCM wg kryteriów rozpoznawania DCM u krewnych [12], która odpowiada wczesnej, przedklinicznej fazie DCM).

Wśród nosicieli *TTN*tv stwierdzono niepełną penetrację choroby, rozumianej jako wystąpienie DCM lub kardiomiopatii nieokreślonej. Była ona wyższą u mężczyzn niż u kobiet ( $p=0,004$ ) i w wieku 33 lat wynosiła 61% vs 18%, a w wieku 61 lat - 95% vs 54%. Mediana wieku rozpoznania kardiomiopatii (rozstrzeniowej lub nieokreślonej) u mężczyzn wyniosła 28 lat, a wśród kobiet 56 lat. Wśród nosicieli mutacji w okresie obserwacji u 8 (17%) osób wystąpiła esHF (2 zgony z powodu HF, 5 HTx, 1 wszczepienie LVAD), istotnie częściej u mężczyzn niż u kobiet ( $p=0,018$ ).

Zwraca uwagę, że aż u 8 (47%) spośród 17 probandów z *TTN*tv zidentyfikowano rzadkie warianty także w innych genach powiązanych z kardiomiopatiami. Co więcej, wśród krewnych, u których rozpoznano DCM, obecność dodatkowego rzadkiego wariantu stwierdzono w 7 (78%) na 9 osób. Wszystkie dodatkowe warianty były wariantami zmiany sensu, natomiast cechowały się różną przewidywalną patogenicznością i znaczeniem klinicznym wg zastosowanych modeli bioinformatycznych. Ich obecność oraz niepełna penetracja choroby wskazuje na możliwy wpływ innych czynników genetycznych na przebieg kardiomyopatii.

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

Chmielewski P., Michalak E., Kowalik I., Franaszczyk M., Sobieszcańska-Matek 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

W wyniku badania genetycznego pacjentów z DCM zidentyfikowano 18 różnych patogennych wariantów *LMNA* u 21 niespokrewnionych probantów – badanie NGS było wykonane tylko u 5 probantów, a w przypadku 16 z nich badano wyłącznie dwanaście eksonów *LMNA* i ich intronowe regiony flankujące. U ośmiu probantów wykryto warianty zmiany sensu (missensowne), wśród pozostałych 13 probantów siedem osób miało warianty nonsensowne, cztery zmiany ramki odczytu, jedna miała dużą delecję, a jedna wariant splicingowy. Następnie w wyniku kaskadowego badania krewnych zidentyfikowano kolejnych 32 nosicieli mutacji w *LMNA*.

W czasie oceny wyjściowej spośród probantów 18 osób miało postawione rozpoznanie DCM lub HNDC, a 3 osoby – kardiomiopatii nieokreślonej. Wśród krewnych rozpoznanie DCM było postawione tylko u 4 (13%) osób, kardiomiopatii nieokreślonej u 18 (56%) osób, a u 10 (31%) osób nie stwierdzono istotnych nieprawidłowości w badaniach obrazowych i elektrokardiograficznych. Krewni byli o średnio 11 lat młodsi od probantów (29 vs 40 lat,  $p=0,002$ ), co pozwoliło na lepsze poznanie wczesnej fazy choroby. Istotnie częściej stwierdzane u probantów były objawy HF i dysfunkcja skurczowa LK (71% vs 13%,  $p<0,0001$  w obu przypadkach), a także przedsiolkowe zaburzenia rytmu serca (62% vs 19%,  $p=0,002$ ) i nsVT (100% vs 36%,  $p<0,0001$ ). Co interesujące, choć AVB był obecny u prawie połowy krewnych (44 vs 85% u probantów,  $p=0,003$ ), LBBB stwierdzono wyłącznie u probantów. W obu grupach często wykrywane było podwyższone stężenie hsTnT (37% vs 67%,  $p = 0,065$ ) oraz NT-proBNP (36% vs 82%,  $p=0,003$ ).

Penetracja nieprawidłowości kardiologicznych w przebiegu kardiolaminopatii była zależna od wieku. Najwcześniejszą nieprawidłowością było podwyższone stężenie hsTnT, które było stwierdzane w drugiej i trzeciej dekadzie życia z częstością odpowiednio 12% i 27% i wyprzedzało wystąpienie AVB i HF (po 5% w drugiej i po 15% w trzeciej dekadzie życia) oraz MVA (odpowiednio 2% i 13%). W czasie obserwacji stwierdzono umiarkowany, ale istotny wzrost stężenia biomarkerów, odzwierciedlający postępujący charakter schorzenia: o 15% w przypadku hsTnT oraz o 114% w przypadku NT-proBNP. W siódmej dekadzie życia penetracja wykładników kardiolaminopatii była niemal całkowita: u 98% pacjentów wystąpił AVB, u 100% arytmie przedsionkowe, 90% miało objawy HF, u 92% podwyższone było stężenie hsTnT, a u 100% - NT-proBNP.

W badanej kohorcie przeanalizowano różnice fenotypowe pomiędzy nosicielami mutacji typu zmiany sensu oraz pozostałymi. Co ciekawe, u nosicieli mutacji zmiany sensu stwierdzono częstsze występowanie dysfunkcji skurczowej LK (69 vs 33%,  $p=0,02$ ) oraz LBBB (55 vs 14%,  $p=0,02$ ), mogło to jednakże wynikać z większego odsetka probantów w tej grupie (62 vs 33%,  $p=0,06$ ). Pomiędzy grupami nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w stężeniach biomarkerów.

W czasie obserwacji o medianie 4,2 roku u 14 (26%) pacjentów rozwinęła się esHF: 3 z nich zmarło z powodu HF, a u 11 doszło do HTx. Wystąpił jeden przypadek SCD, u jednego pacjenta doszło do SCA ze skuteczną resuscytacją. 10 (29%) spośród 34 pacjentów ze wszczepionym ICD doświadczyło jego adekwatnego wyładowania. O ile progresja do esHF miała miejsce wyłącznie u osób z rozpoznaną DCM / HNDC, epizody MVA wystąpiły również u 19% osób z kardiomiopatią nieokreśloną.

Jednoczynnikowe analizy zdarzeń MVA występujących podczas obserwacji nie wykazały istotnego statystycznie wpływu płci i rodzaju mutacji na ryzyko jego wystąpienia, natomiast potwierdziły znaczenie takich czynników ryzyka, jak obecność AVB, nsVT lub obniżona LVEF. Co ważne, silnie powiązane z występowaniem MVA było stężenie NT-proBNP  $\geq 150$  pg/ml oraz hsTnT  $\geq 20$  ng/l ( $HR > 13$ ,  $p \leq 0,02$  w obu przypadkach). W analizie wieloczynnikowej z selekcją wsteczną stężenie NT-proBNP  $\geq 150$  pg/ml było jedynym niezależnym czynnikiem ryzyka wystąpienia MVA.

Wieloczynnikowe analizy zdarzeń esHF występujących w ciągu całego życia wykazały, że zagrożenie nimi jest większe u mężczyzn (HR 6,2,  $p=0,002$ ) oraz u nosicieli mutacji zmiany sensu (HR 3,8,  $p=0,03$ ). Czynniki te nie miały natomiast wpływu na ryzyko wystąpienia MVA.



### **6.3. 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., Sobieszcańska-Matek 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

Badania genetyczne metodą NGS u pacjentów z DCM, które zaowocowały w 2017 r. publikacją nr 1, były kontynuowane w kolejnych latach. W ich wyniku zidentyfikowano łącznie w latach 2015-2021 41 wariantów skracających *TTN* u 46 niespokrewnionych probantów; dwie mutacje były stwierdzone u dwóch probantów każda, a jedna aż u czterech. W prążku A zlokalizowanych było 28 spośród nich, natomiast 10 było umiejscowionych w prążku I, jedna w prążku M i dwie w dysku Z. Trzech probantów wykluczono z badania ze względu na obecność patogennych wariantów w innych genach powiązanych z kardiomiopatiami. W wyniku badania krewnych zidentyfikowano kolejnych 65 nosicieli *TTN*tv.

Badana kohorta składała się z 70 pacjentów z rozpoznaną DCM, 25 zdrowych krewnych bez cech kardiomiopatii oraz 13 osób z nieprawidłowościami w badaniach obrazowych lub elektrokardiograficznych pozwalającymi na rozpoznanie kardiomiopatii nieokreślonej.

Pacjenci z DCM byli młodzi (średnia wieku 40 lat), większość stanowili mężczyźni (79%) z objawami łagodnej HF w czasie oceny wyjściowej (80% w klasie NYHA I/II), średnia LVEF wyniosła 36%, a mediana stężenia NT-proBNP 534 pg/ml. Arytmie przedsionkowe stwierdzono u 31% pacjentów z DCM, a nsVT u 55%. Nie stwierdziliśmy istotnej różnicy w wieku pomiędzy nimi a ich krewnymi bez rozpoznanej DCM, co wskazuje na niepełną penetrację z łagodnym przebiegiem kardiomyopatii u niektórych nosicieli, 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,  $p < 0,001$ ).

Penetracja nieprawidłowości kardiologicznych w przebiegu kardiomyopatii była zależna od wieku. Najwcześniejszymi wskaźnikami choroby były nieprawidłowości w badaniu echokardiograficznym, na które składały się dysfunkcja skurczowa lub rozstrzeń lewej komory, określone wspólnie jako dysfunkcja lewej komory. Wykrywane one były w drugiej, trzeciej i czwartej dekadzie życia odpowiednio u 8%, 26% i 47% nosicieli i wyprzedzały o 5–10 lat pojawienie się objawów HF, wzrost stężenia NT-proBNP, wystąpienie ciężkiej (choć często odwracalnej) dysfunkcji skurczowej LK (LVEF <35%), a także arytmii komorowej. Arytmie przedsionkowe i zaburzenia przewodzenia pojawiały się późno w przebiegu kardiomyopatii, a podwyższone stężenie hsTnT było wskaźnikiem schyłkowej fazy choroby.

Obserwacje dotyczące kolejności występowania nieprawidłowości przeprowadzone w grupie wszystkich nosicieli mogą być zaburzone przez fakt, że choroba stosunkowo często była wykrywana dopiero w późnym stadium, kiedy obecne były już jej liczne wyznaczniki i odtworzenie kolejności ich pojawienia się jest niemożliwe. Dlatego analizę tę powtórzono na grupie 49 nosicieli, którzy zgłosili się do Ośrodka w celu wykonania badań przesiewowych, a nie z powodu stwierdzonych wcześniej nieprawidłowości. Także w tej grupie najwcześniejszym markerem choroby była dysfunkcja LK, wykryta u 21 (43%) pacjentów, przy czym u 8 stwierdzono izolowaną rozstrzeń LK, u 5 dysfunkcję skurczową LK bez rozstrzeni, a u 8 – równocześnie obie nieprawidłowości. W okresie obserwacji rozpoznanie DCM postawiono łącznie u 11 (22%) spośród pacjentów, którzy zgłosili się do Ośrodka na badania przesiewowe, lecz objawy HF wystąpiły u zaledwie u jednego. Stężenie NT-proBNP było podwyższone u zaledwie 28% pacjentów ze stwierdzoną echokardiograficznie dysfunkcją LK. Pomimo powtarzanych 12-odprowadzeniowych EKG oraz rejestracji EKG metodą Holtera zaburzenia rytmu i przewodzenia wykrywane były rzadko, tym niemniej u 4 (12%) spośród 49 pacjentów ocenianych w ramach badań przesiewowych były najwcześniejszym markerem choroby.

Mediana obserwacji w całej grupie 108 nosicieli *TTN*tv wyniosła 5,2 roku. W tym okresie u 13 (12%) pacjentów rozwinęła się esHF: 5 pacjentów zmarło z powodu HF, a u ośmiu przeprowadzono HTx. MVA wystąpiły również u 13 (12%) pacjentów, w większości

składały się na nie adekwatne interwencje ICD, u jednej osoby doszło do SCD, a u dwóch wystąpiło SCA 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 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  $\geq 650$  pg/ml było najlepszym predyktorem MVA w okresie 6 lat obserwacji (HR 11,7,  $p = 0,002$ ) i przewyższało takie czynniki ryzyka jak obniżona LVEF, LBBB czy nsVT. Stężenie NT-proBNP  $\geq 650$  pg/ml okazało się również najlepszym predyktorem złożonego punktu końcowego, obejmującego zarówno MVA, jak i esHF.

## 7. Dyskusja

Częstość występowania *TTN*tv w przedstawionej w publikacji nr 1 grupie pacjentów z DCM (24%) oraz rodzinną postacią DCM (30%) była nieznacznie wyższa niż odpowiednio 11-22% i 18-27% stwierdzane przez innych badaczy [19, 48, 63]. Może to wynikać z profilu pacjentów kierowanych do naszego Ośrodka: badana grupa obejmowała młodych pacjentów z zaawansowaną NS oraz często (w 46% przypadków) dodatnim wywiadem rodzinnym. Podobnie jak w pracy Hermana i wsp. ekspresja fenotypowa pacjentów z *TTN*tv nie różniła się istotnie od DCM spowodowanej innymi przyczynami poza rzadszym występowaniem zaburzeń przewodnictwa [19].

*TTN*tv charakteryzują się niepełną penetracją, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów [21, 64]. Sugeruje to możliwy wpływ innych czynników genetycznych, a także środowiskowych na przebieg kardiomyopatii. W tym kontekście zainteresowanie budzi stwierdzenie rzadkich wariantów w innych genach powiązanych z kardiomiopatiami aż u 8 spośród 17 probantów z *TTN*tv oraz u 7 spośród 9 krewnych, którzy mieli postawione rozpoznanie DCM. Obserwacja ta wspiera hipotezę, że *TTN*tv są w istocie czynnikami zwiększonej podatności na zachorowanie, ale do wystąpienia DCM często potrzebne jest współistnienie innych czynników genetycznych lub środowiskowych [65, 66].

W publikacji nr 1 po raz pierwszy wykazaliśmy, że płeć męska związana jest z większym stopniem penetracji kardiomyopatii. W zgodności z wcześniejszymi doniesieniami pozostaje gorsze rokowanie w odniesieniu do wystąpienia esHF u mężczyzn [19].

Coraz powszechniejsze stosowanie badania NGS dla oceny podłoża genetycznego DCM zaowocowało w kolejnych latach licznymi publikacjami z wielu ośrodków. Kardiolaminopatie, których diagnozowanie dzięki niewielkim rozmiarom *LMNA* było możliwe przy użyciu sekwencjonowania Sangera, zostały dość dobrze scharakteryzowane już wcześniej [26, 28, 29]. Nowo publikowane prace skutkowały natomiast coraz lepszym poznaniem obrazu klinicznego DCM rozwijającej się również na podłożu mutacji w *TTN* [20, 22, 24, 25, 49], a także w innych genach [67-70]. Żadne z tych doniesień nie dotyczyło jednak przydatności diagnostycznej biomarkerów w genetycznie uwarunkowanej DCM.

Wiadomo, że stężenia NT-proBNP, ale także hsTnT są często podwyższone w przewlekłej HF i że wiąże się to z wyższą śmiertelnością całkowitą i sercowo-naczyniową. Zwraca uwagę, że mediany stężeń biomarkerów w poszczególnych badanych grupach różnią się istotnie, np. w największej grupie uczestników badania Val-HeFT mediana stężenia hsTnT wynosiła 12,5 ng/l, podczas gdy w badaniu VitD-CHF było to zaledwie 4,4 ng/l, a w badaniu Nakamury i wsp. – 28,0 ng/l [51]. Różnice te można wytłumaczyć takimi czynnikami jak wiek, zaawansowanie HF czy obecność chorób towarzyszących. Nie można jednak wykluczyć, że mogą one wynikać także z innych czynników, np. z różnic etiologii choroby, w tym jej uwarunkowań genetycznych [71]. Identyfikacja czynników genetycznych, które prowadzą np. do wczesnego uwalniania troponiny, a także weryfikacja, czy nie wiąże się to z niekorzystnym rokowaniem, mogłyby mieć duże znaczenie kliniczne.

Zbadanie przydatności diagnostycznej oraz rokowniczej biomarkerów sercowych stało się zatem ważną częścią kolejnych publikacji stanowiących podstawę mojej rozprawy doktorskiej.

Publikacja nr 2 dotyczyła charakterystyki klinicznej nosicieli mutacji w *LMNA*, a więc drugiej co do częstości genetycznej przyczyny DCM [38]. Ważną obserwacją było to, że podwyższone stężenie hsTnT może być najwcześniejszym markerem kardiolaminopatii. W zgodności ze spostrzeżeniami innych autorów [31, 32] pokazaliśmy, że kardiomiopatia uwarunkowana mutacjami w *LMNA* charakteryzuje się zależną od wieku i wysoką penetracją takich nieprawidłowości jak AVB, arytmie przedsionkowe, HF czy MVA. Pomimo niskiego wieku badanej populacji (średnio 40 lat dla probantów oraz 29 lat dla krewnych) aż u 69% krewnych obecne były nieprawidłowości, mogące być podstawą rozpoznania kardiomiopatii. Odsetek ten u innych badaczy był niższy (49-57%) pomimo wyższego wieku badanych [31, 72], co może wynikać z różnic w przyjętych kryteriach rozpoznania kardiomiopatii, ale również z rzadszego wykonywania niektórych badań, np. rejestracji EKG metodą Holtera.

Wyniki naszej pracy wskazują, że podwyższone stężenie hsTnT wyprzedza wystąpienie innych nieprawidłowości i może stanowić sygnał do pogłębienia diagnostyki, rozważenia leczenia lub przynajmniej zalecenia modyfikacji stylu życia.

W naszej kohorcie nosicieli mutacji *LMNA* w przypadku wariantów zmiany sensu stwierdzono częstsze występowanie LBBB, co może jednakże wynikać z większego odsetka

probandów tej grupie i większego zaawansowania dysfunkcji skurczowej LK. Inni autorzy donosili o podobnym zaawansowaniu dysfunkcji skurczowej LK oraz częstszym występowaniu AVB u nosicieli mutacji nie-missensownych [33], natomiast brak doniesień o związku pomiędzy typem mutacji a częstością LBBB.

Innym ważnym wnioskiem jest silny, niezależny związek pomiędzy podwyższonym stężeniem NT-proBNP a zagrożeniem MVA. W dotychczasowych badaniach nad kardiolaminopatią wskazywano na rolę takich czynników ryzyka MVA jak obniżona LVEF, nsVT, AVB czy płeć męska [28, 35], zaś zmiennie określano znaczenie typu mutacji [31, 72, 73]. Dotychczas nie badano w tym kontekście znaczenia stężenia biomarkerów. W naszym badaniu nie wykazano znaczenia typu mutacji w ocenie ryzyka arytmicznego, a stężenie NT-proBNP  $\geq 150$  pg/ml było najlepszym predyktorem MVA. W analizie jednoczynnikowej silny był również związek pomiędzy stężeniem hsTnT  $\geq 20$  ng/l a ryzykiem MVA, natomiast nie został on potwierdzony w analizie wieloczynnikowej i jego rola wymaga dalszej oceny. Choć prognostyczna wartość stężenia hsTnT w HF jest dobrze udokumentowana [18], to dotyczy to przede wszystkim rokowania w ostrej HF [18], a także przewidywania ryzyka zgonu lub hospitalizacji z powodu HF [51].

Wyniki badania prezentowanego w publikacji nr 3 wskazują, że również w grupie nosicieli *TTN*tv podwyższone stężenie NT-proBNP jest najlepszym predyktorem MVA. Groźne arytmie komorowe u pacjentów z DCM na podłożu tytynopatii występują częściej niż w DCM wynikającej z innych przyczyn [22, 49]. Wiadomo też, że do incydentów MVA dochodzi głównie u pacjentów z zaawansowaną dysfunkcją skurczową LK [24]. Wykazano, że do czynników złego rokowania odnośnie wystąpienia złożonego punktu końcowego obejmującego MVA i esHF należy płeć męska oraz niska LVEF [24], natomiast nie podjęto dotychczas prób identyfikacji czynników ryzyka wystąpienia MVA w tej populacji. Wyniki naszego badania wskazują, że stężenie NT-proBNP  $\geq 650$  pg/ml przewyższa inne potencjalne markery ryzyka, w tym nsVT, LBBB, a także niską LVEF, uważaną za najważniejszy czynnik ryzyka SCD w populacji pacjentów z HF i obniżoną LVEF [18].

Rola biomarkerów w wykrywaniu wczesnej postaci kardiomiopatii na podłożu *TTN*tv przedstawia się inaczej niż w przypadku kardiolaminopatii. Podwyższone stężenie hsTnT wydaje się markerem schyłkowej, a nie wczesnej fazy choroby. Najwcześniej wykrywana jest

dysfunkcja LK w badaniu echokardiograficznym, rozumiana jako rozstrzeń LK lub obniżona LVEF. Stężenie NT-proBNP jest rzadko podwyższone u pacjentów w tej fazie choroby i wzrasta dopiero wraz z pojawieniem się objawów HF. Oznaczenia biomarkerów nie mogą zatem zastąpić echokardiografii w wykrywaniu wczesnej fazy kardiomyopatii.

Arytmie przedsionkowe stwierdziliśmy u 23%, a komorowe u 40% pacjentów, a więc z nieco niższą częstością niż w największym dotychczas badaniu Akhtara i wsp. [24]. Może to wynikać z niższego wieku i mniej zaawansowanej dysfunkcji skurczowej LK w naszej kohorcie. Wspólna dla obu badań jest obserwacja, że częstość arytmii wzrasta wraz z progresją dysfunkcji skurczowej LK.

Zaburzenia rytmu serca bywają jednak wykrywane również u nosicieli *TTN*tv z zachowaną kurczliwością LK, czego dowodzą duże badania populacyjne [74, 75]. Co więcej, w badaniu Vissinga i wsp. u 16% pacjentów z DCM na podłożu *TTN*tv wystąpienie AF poprzedziło rozpoznanie kardiomyopatii, a u 11% pierwszym objawem choroby było SCA [25]. Wśród nosicieli *TTN*tv, którzy zgłosili się do naszego Ośrodka na badanie przesiewowe, zaburzenia rytmu były najwcześniej stwierdzonym markerem choroby w 12% przypadków. Obserwacja ta potwierdza, że możliwe są różne kliniczne scenariusze kardiomyopatii.

Pomimo wcześniejszych doniesień sugerujących, że patogenne *TTN*tv zlokalizowane są przeważnie w prążku A, aktualne badanie wskazuje, że podobnie jak w badaniu Akhtara i wsp. patogenne *TTN*tv u pacjentów z DCM mogą być zlokalizowane we wszystkich domenach genu [24].

Bezpośrednie porównanie omówionych w publikacjach nr 2 i nr 3 kohort nie byłoby właściwe choćby dlatego, że większość probantów, u których wykryto mutacje w *LMNA*, nie miało wykonanego badania NGS i nie można wykluczyć (choć jest to mało prawdopodobne) obecności patogennych wariantów w innych genach, w tym w *TTN*. Różnice w przebiegu tych dwóch najczęstszych form uwarunkowanej genetycznie DCM są jednak uderzające, również w odniesieniu do wczesnych markerów choroby: w przebiegu kardiomyopatii najwcześniej wykrywane jest podwyższone stężenie hsTnT, a następnie zaburzenia rytmu i przewodzenia; w kardiomyopatii pierwszym markerem choroby jest stwierdzana echokardiograficznie dysfunkcja LK, a za nią następuje wzrost stężenia NT-proBNP i pojawienie się objawów HF.

Opublikowane prace pochodzą z poradni zajmującej się dziedzicznymi chorobami układu sercowo-naczyniowego, pracującej w strukturach Narodowego Instytutu Kardiologii, szpitala referencyjności trzeciego stopnia, jednego z wiodących ośrodków w Polsce pod względem liczby przeprowadzonych HTx, dlatego zrekrutowani pacjenci mogą odbiegać od chorych przyjmowanych w innych ośrodkach niższym wiekiem, większym zaawansowaniem choroby oraz częstszym dodatnim wywiadem rodzinnym. Podstawowym ograniczeniem badań jest stosunkowo mała liczebność grup badanych, co wynika z ich jednoośrodkowego charakteru. Skutkowało to m.in. niewielką liczbą zdarzeń sercowo-naczyniowych, co wykluczyło zastosowanie modeli analizy wielowymiarowej. Badania miały charakter retrospektywny i mogły zawierać czynniki zakłócające.

### **Najważniejsze wnioski.**

1. Warianty skracające *TTN* są ważną przyczyną dziedzicznej DCM, stwierdzoną u prawie jednej czwartej chorych z DCM diagnozowanych i leczonych w Ośrodku Badań Przesiewowych IK w Warszawie. Pacjenci z DCM na podłożu *TTN*tv nie wykazują istotnych różnic 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. Ryzyko wystąpienia kardiomiopatii, a także jej progresji do esHF jest większe u nosicieli *TTN*tv płci męskiej niż u kobiet.

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 AVB, arytmii komorowej i HF. Ocena biomarkerów sercowych może być zatem przydatna w wykrywaniu kardiolaminopatii.

2b. W przebiegu kardiotytnopatii 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 pojawiają się późno w przebiegu kardiomyopatii, 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.

## 8. Streszczenie

### 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 dziedzicznej 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 wczesnie 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* (*TTNtv*) są najczęstszą genetyczną przyczyną DCM, identyfikowaną w ok. 20% przypadków DCM.

Wykazano, że rokowanie w kardiomyopatii jest podobne jak w innych postaciach DCM. Stwierdzano dobrą odpowiedź na klasyczne leczenie HF. Zagrożenie zaburzeniami rytmu serca w kardiomyopatii 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).

Kardiomyopatie 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 mogłyby to

pozwoić 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 (probandów 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 wspomaganie 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 przeciwarrytmiczna 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* (*TTNtv*) 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*.

Probandi ze zidentyfikowanym *TTNtv* 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 *TTNtv* i bez nich (29% vs 31%,  $p=0,91$ ).

Wśród nosicieli *TTNtv* stwierdzono niepełną penetrację choroby, wyższą u mężczyzn niż u kobiet ( $p=0,004$ ). Wśród nosicieli *TTNtv* 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. Probandi 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, nieutralonego częstoskurczu komorowego (nsVT) lub obniżonej LVEF, a ponadto silnie powiązane z występowaniem MVA było stężenie NT-proBNP  $\geq 150$  pg/ml i hsTnT  $\geq 20$  ng/l ( $HR > 13$ ,  $p \leq 0,02$  w obu przypadkach). W analizie wieloczynnikowej z selekcją wsteczną stężenie NT-proBNP  $\geq 150$  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 *TTNtv*.

Badana kohorta nosicieli *TTNtv* 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 kardiomyopatii 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 kardiomyopatii, a podwyższone stężenie hsTnT było wskaźnikiem schyłkowej fazy choroby.

Mediana obserwacji w grupie 108 nosicieli *TTNtv* 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  $\geq 650$  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 różnic 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 kardiomyopatii 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 kardiomyopatii, 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.

## 9. Streszczenie w języku angielskim

### Abstract

#### Introduction

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a disease of great social importance, as it often affects young people, limits their professional and family activity, and may lead to sudden cardiac death or end-stage heart failure. It is characterized by a significant phenotypic diversity, and in the preclinical phase, it can be expressed, inter alia, in the form of isolated left ventricular dilatation or arrhythmias.

The etiology of DCM is complex, but genetic factors are known to play a significant role. The diversity of the clinical course, prognosis and response to treatment is largely due to the etiological heterogeneity, including the complexity of the genetic background with several dozen genes spanning different gene ontologies. Exploring the genetic background and subsequent differences in clinical trajectories may contribute - in line with the postulates of personalized medicine - to the development of new treatment methods, potentially more effective, because targeted at the mechanism of the disease.

In recent years, there have been tremendous knowledge advancements in the field. However, the natural history of these rare diseases is still little known, making clinical decisions difficult.

DCM-causing variants (mutations) are most often found in the *TTN* and *LMNA* genes.

*LMNA*, encoding the nuclear protein lamin A/C, was the first identified gene whose mutations result in DCM inherited in autosomal dominant mode. They are responsible for approx. 6% of DCM cases.

*LMNA*-dependent cardiomyopathy differs from most DCM cases by rapid disease progression and is characterized by a high frequency of serious adverse events, both arrhythmic, including sudden cardiac death, and related to heart failure (HF), leading to end-

stage disease. Atrioventricular block and atrial arrhythmias are usually found early in cardiomyopathies, anticipating ventricular arrhythmias and onset of HF symptoms.

In 2002, it was demonstrated for the first time that DCM may also be caused by mutations in the *TTN* gene, which encodes the giant striated muscle protein titin, which is the supporting component of the sarcomere. The adoption of next generation sequencing (NGS) at the end of the 2000s has facilitated examination of large genes such as *TTN*. In 2012, the first study was published assessing the prevalence of mutations in *TTN* in patients with DCM. Initially, however, their causative role was contested. In the European atlas of the clinical genetics of DCM published in 2015, *TTN* truncating variants (*TTN*tv) were not considered the most frequent. Currently, *TTN*tv are known as the most common genetic cause of DCM, identified in approx. 20% of DCM cases.

The prognosis in cardiomyopathy has been shown to be similar to that in other types of DCM. A good response to typical HF treatment has been demonstrated. The risk of arrhythmias in cardiomyopathy has not been well defined, although the presence of *TTN*tv has been shown to be a risk factor for sustained ventricular arrhythmia in a cohort of DCM patients with implanted cardioverter-defibrillator (ICD).

The phenotypes of *TTN*- and *LMNA*-related cardiomyopathies are among the best characterized. However, the previous studies did not include the assessment of the diagnostic and prognostic usefulness of the biomarker profile. Assessing the risk of sudden cardiac death is particularly significant, as it can guide the decision about prophylactic ICD implantation.

Identification of the DCM-causative variants in probands allows the search for mutation carriers in the probands' families who are at high risk of developing the disease (even if currently asymptomatic) and require periodic screening to detect the disease at an early stage. The optimal screening strategy is not yet established. Therefore, it would be helpful to identify disease markers that appear first in its course. Again, the usefulness of cardiac biomarkers has not been evaluated in this context.

## **Aims of the studies**

1. Verification of the prevalence of *TTN* truncating variants in DCM population and assessment of their clinical significance by comparing the phenotypic characteristics and prognosis of *TTN*tv-positive and *TTN*tv-negative probands (publication No. 1 - 2017).

2. Clinical characteristics of DCM-causative mutation carriers, including the cardiac biomarkers; analyzing the natural history of cardiomyopathy to identify its early markers

*a) among LMNA mutation carriers (publication No. 2 - 2020),*

*b) among TTN mutation carriers (publication No. 3 - 2022).*

3. Assessment of the prognostic role of cardiac biomarkers in predicting sudden cardiac death or its equivalents and comparing it with currently used risk factors

*a) among LMNA mutation carriers (publication No. 2 - 2020),*

*b) among TTN mutation carriers (publication No. 3 - 2022).*

## **Material and methods**

The study cohorts were recruited from DCM patients and their relatives diagnosed and treated at the Unit for Screening Studies in Inherited Cardiovascular Diseases of the National Institute of Cardiology, Warsaw in 2010-2020. Genetic testing was offered to all DCM probands, and subsequently also to their relatives, in accordance with the principles of family cascade screening. Genetic testing was performed using NGS except when a pathogenic variant in one of the cardiomyopathy-associated genes had been identified earlier using other methods. Variants identified in probands were followed-up in relatives with Sanger sequencing.

The medical records of patients (probands and relatives) were analyzed retrospectively, in particular the data from the first documented visit to the Institute, prior medical records and follow-up data. Baseline characteristics included medical history, physical examination, 12-lead electrocardiography, two-dimensional echocardiography, Holter ECG monitoring, and laboratory tests, including cardiac biomarkers measured in the period of clinical stabilization:

high-sensitivity cardiac troponin T (hsTnT) and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP). All records were reviewed for the first documented occurrence of disease indicators such as echocardiographic abnormalities (left ventricular systolic dysfunction, left ventricular dilatation), symptoms of HF, arrhythmias, conduction disturbances and increased concentrations of cardiac biomarkers, and on this basis, the penetrance of individual disease symptoms was calculated using the Kaplan-Meier method.

In order to assess the prognosis, major cardiovascular events were documented, in particular: 1. end-stage heart failure (esHF), defined as death due to heart failure, heart transplantation or left ventricular assist device implantation; 2. malignant ventricular arrhythmia (MVA), defined as sudden cardiac death or its equivalents: successful resuscitation due to sudden cardiac arrest, sustained, hemodynamically unstable ventricular tachycardia or adequate ICD intervention (antiarrhythmic pacing or shock).

## Results

**Publication No. 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

In the group of 72 probands diagnosed with DCM who underwent NGS in 2012-2014, 16 *TTN* truncating variants (*TTN*tv) were identified in 17 probands (24% of all DCM probands, including 30% in the familial DCM, and 18% in the sporadic DCM). As a result of cascade screening in relatives, another 29 *TTN*tv carriers were identified.

*TTN*tv-positive probands did not differ significantly from the *TTN*tv-negative ones in age or sex. Similar in both groups were the NYHA functional class, left ventricular ejection fraction (LVEF), the prevalence of atrial fibrillation, and the percentage of subjects with an ICD. Atrioventricular conduction disturbances or left bundle branch block (LBBB) were significantly less common in *TTN*tv-positive probands.

During the median follow-up of 5.3 years, no significant differences were found in the incidence of esHF between probands with and without *TTN*tv (29% vs 31%,  $p=0.91$ ).

The disease penetrance was incomplete among *TTN*tv carriers, higher in men than in women ( $p=0.004$ ). During the follow-up period, 17% of *TTN*tv carriers developed esHF, significantly more often among men than among women ( $p=0.018$ ).

**Publication No. 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

As a result of genetic testing of DCM patients, 18 different pathogenic LMNA variants were identified in 21 probands. As a result of cascade screening in probands' relatives, another 32 LMNA mutation carriers were identified.

At baseline, 18 probands were diagnosed with DCM or non-dilated hypokinetic cardiomyopathy, and 3 with indeterminate cardiomyopathy. Among relatives, the diagnosis of DCM was made only in 4 patients, indeterminate cardiomyopathy in 18 patients, and in 10 patients there were no significant abnormalities in imaging tests and electrocardiography. The probands were on average 11 years older than their relatives (40 vs 29 years, respectively,  $p=0.002$ ) and were characterized by more severe HF symptoms, lower LVEF, more frequent arrhythmia, and a higher concentration of NT-proBNP. Atrioventricular block was present in almost half of the relatives (44%), while LBBB was found only in the probands. Elevated levels of hsTnT and NT-proBNP were often detected in both groups (67% vs 37%,  $p=0.065$  and 82% vs 36%,  $p=0.003$ , respectively).

Penetrance of cardiac abnormalities in the course of cardiomyopathy was age-dependent. The earliest abnormality was elevated hsTnT level, present in the 2nd and 3rd decades of life in 12% and 27% of LMNA mutation carriers, respectively, preceding atrioventricular block and HF (5% each in the 2nd and 15% each in the 3rd decade of life), and MVA (2% and 13%, respectively). In the 7th decade of life, the penetrance of cardiomyopathy indicators was almost complete: 98% of patients developed atrioventricular block, 100% had atrial arrhythmias, 90% had HF symptoms, 92% elevated hsTnT, and 100% elevated NT-proBNP levels.

During a median follow-up of 4.2 years, 14 (26%) patients developed esHF: three of them died of HF and eleven underwent heart transplantation. There was one sudden cardiac

death, another patient had sudden cardiac arrest with successful resuscitation. 10 (29%) of 34 patients with implanted ICD experienced its adequate discharge.

The univariable analysis of MVA events during follow-up showed no impact of sex and mutation type on MVA occurrence and confirmed the involvement of established risk factors, such as the presence of atrioventricular block, non-sustained ventricular tachycardia (nsVT) or decreased LVEF. Moreover, NT-proBNP concentration  $\geq 150$  pg/mL and hsTnT  $\geq 20$  ng/L could be even more potent risk factors of MVA (HR > 13,  $p \leq 0.02$  in both cases). In multivariable analysis, elevated NT-proBNP level was the only indicator of the occurrence of MVA.

**Publication No. 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

NGS testing in DCM patients from our Unit, which resulted in publication No. 1 in 2017, was continued in the following years. As a result, 41 TTN truncating variants were identified in 46 probands. Three of them were excluded from the study due to the presence of likely pathogenic variants in other cardiomyopathy-associated genes. As a result of cascade screening in relatives, another 65 TTNtv carriers were identified.

The study cohort was composed of 70 patients diagnosed with DCM, 13 patients with indeterminate cardiomyopathy, and 25 healthy relatives with no signs of cardiomyopathy. The DCM patients were young (mean age 40 years), the majority of them were male (79%) with features of mild HF at baseline: 80% were in NYHA class 1–2, the mean LVEF was 36% and the median NT-proBNP concentration was 534 pg/mL. Atrial arrhythmias were found in 31%, and nsVT in 55% of them. There was no significant difference in age between them and their non-DCM relatives, suggesting incomplete penetrance, especially in women who made up the majority (68%) of the non-DCM group. The concentration of hsTnT was significantly higher in the DCM group, but it remained low (median 6.7 vs <3.0 ng/L, respectively).

Penetrance of cardiac abnormalities in the course of cardiotitinopathy was age-dependent. The earliest abnormality was left ventricular dysfunction, defined as left ventricular systolic dysfunction or dilatation, detected in the 2nd, 3rd, and 4th decades of life in 8%, 26%, and

47% of carriers, respectively. It preceded the onset of HF symptoms and the increase in NT-proBNP concentration by 5-10 years, as well as the onset of severe (often reversible) left ventricular systolic dysfunction (LVEF <35%) and ventricular arrhythmia. Atrial arrhythmias and conduction disturbances appeared late in the course of cardiomyopathy, and elevated hsTnT level seemed to be an indicator of the end stage.

During the median follow-up of 5.2 years, 13 (12%) of 108 *TTN*tv carriers developed esHF: 5 patients died of HF, and 8 were transplanted. MVA also occurred in 13 (12%) patients, and consisted mostly of adequate ICD interventions, one patient died suddenly, and two had sudden cardiac arrest interrupted by cardiopulmonary resuscitation.

The univariable analysis of MVA events showed the possible influence of risk factors such as the presence of atrial arrhythmias, LBBB, nsVT, or severely reduced LVEF. NT-proBNP concentration was strongly associated with the occurrence of MVA, while the concentration of hsTnT had no significant effect. In multivariable analysis, NT-proBNP concentration  $\geq 650$  pg/mL was the best predictor of MVA and outperformed other risk factors such as severely decreased LVEF, LBBB and nsVT.

## **Summary**

1. *TTN* truncating variants are an important cause of hereditary DCM, found in almost one fourth of patients with DCM diagnosed and treated at our Unit. Patients with *TTN*-related DCM do not show significant phenotypic differences compared to other DCM patients, except for a low prevalence of atrioventricular and intraventricular conduction disturbances. The presence of *TTN*tv in patients with DCM does not increase the risk of progression to end-stage HF.

2a. Cardiomyopathies are characterized by conduction disturbances and arrhythmias preceding the onset of left ventricular systolic dysfunction and symptoms of HF. Increased concentrations of hsTnT and NT-proBNP are detected often at an early stage of the disease. Penetrance of cardiac abnormalities in the course of cardiomyopathy was age-dependent, with the earliest abnormality being elevated hsTnT levels, preceding the onset of atrioventricular block, ventricular arrhythmia, and HF. Therefore, the assessment of cardiac biomarkers may be useful in the detection of cardiomyopathy.



2b. In the course of cardiomyopathy, the earliest detected abnormalities are dilatation and/or systolic dysfunction of the left ventricle, which precede the symptoms of HF, an increase in NT-proBNP concentration and the occurrence of ventricular arrhythmia. Atrial arrhythmias and conduction disturbances appear late in the course of cardiomyopathy, and the concentration of hsTnT is not elevated in early, but only in the end-stage of the disease. Thus, measurements of cardiac biomarkers cannot replace echocardiography in the detection of an early disease stage in asymptomatic *TTN*tv carriers.

3. Increased NT-proBNP concentration was the strongest risk factor for malignant ventricular arrhythmia in DCM associated with both *TTN*tv and *LMNA* mutations, and outweighed other risk factors such as decreased LVEF and nsVT.

## 10. Piśmiennictwo.

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, i wsp. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29: 270-276.
2. Schultheiss HP, Fairweather D, Caforio ALP, i wsp. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5: 32.
3. Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, i wsp. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report - 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant.* 2019; 38: 1056-1066.
4. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol.* 2013; 10: 531-547.
5. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2017; 390: 400-414.
6. Reichart D, Magnussen C, Zeller T, i wsp. Dilated cardiomyopathy: from epidemiologic to genetic phenotypes: A translational review of current literature. *J Intern Med.* 2019; 286: 362-372.
7. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016; 388: 1545-1602.
8. Escobar-Lopez L, Ochoa JP, Mirelis JG, i wsp. Association of Genetic Variants With Outcomes in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2021; 78: 1682-1699.
9. Gigli M, Merlo M, Graw SL, i wsp. Genetic Risk of Arrhythmic Phenotypes in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2019; 74: 1480-1490.
10. McNally EM, Mestroni L. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res.* 2017; 121: 731-748.
11. Xiao L, Li C, Sun Y, i wsp. Clinical Significance of Variants in the TTN Gene in a Large Cohort of Patients With Sporadic Dilated Cardiomyopathy. *Front Cardiovasc Med.* 2021; 8: 657689.
12. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, i wsp. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical

practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2016; 37: 1850-1858.

13. Jordan E, Peterson L, Ai T, i wsp. Evidence-Based Assessment of Genes in Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*. 2021; 144: 7-19.
14. Akinrinade O, Heliö T, Lekanne Deprez RH, i wsp. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2019; 9: 4093.
15. Richards S, Aziz N, Bale S, i wsp. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17: 405-424.
16. Hershberger RE, Cowan J, Jordan E, i wsp. The Complex and Diverse Genetic Architecture of Dilated Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2021; 128: 1514-1532.
17. Towbin JA, McKenna WJ, Abrams DJ, i wsp. 2019 HRS expert consensus statement on evaluation, risk stratification, and management of arrhythmogenic cardiomyopathy: Executive summary. *Heart Rhythm*. 2019; 16: e373-e407.
18. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, i wsp. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021; 42: 3599-3726.
19. Herman DS, Lam L, Taylor MR, i wsp. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012; 366: 619-628.
20. Tayal U, Newsome S, Buchan R, i wsp. Phenotype and Clinical Outcomes of Titin Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 70: 2264-2274.
21. Jansweijer JA, Nieuwhof K, Russo F, i wsp. Truncating titin mutations are associated with a mild and treatable form of dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2017; 19: 512-521.
22. Corden B, Jarman J, Whiffin N, i wsp. Association of Titin-Truncating Genetic Variants With Life-threatening Cardiac Arrhythmias in Patients With Dilated Cardiomyopathy and Implanted Defibrillators. *JAMA Netw Open*. 2019; 2: e196520.
23. Valverde-Gómez M, Salguero-Bodes R, Martín-Arriscado C, i wsp. Truncating titin variants in dilated cardiomyopathy: not only LVEF recovery, but also maintenance. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2020; 73: 589-592.

24. Akhtar MM, Lorenzini M, Cicerchia M, i wsp. Clinical Phenotypes and Prognosis of Dilated Cardiomyopathy Caused by Truncating Variants in the TTN Gene. *Circ Heart Fail.* 2020; 13: e006832.
25. Vissing CR, Rasmussen TB, Dybro AM, i wsp. Dilated cardiomyopathy caused by truncating titin variants: long-term outcomes, arrhythmias, response to treatment and sex differences. *J Med Genet.* 2021; 58: 832-841.
26. Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, i wsp. Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *Journal of the American College of Cardiology.* 2003; 41: 771-780.
27. Sylvius N, Tesson F. Lamin A/C and cardiac diseases. *Current opinion in cardiology.* 2006; 21: 159-165.
28. van Rijsingen IA, Arbustini E, Elliott PM, i wsp. Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J Am Coll Cardiol.* 2012; 59: 493-500.
29. Saj M, Bilinska ZT, Tarnowska A, i wsp. LMNA mutations in Polish patients with dilated cardiomyopathy: prevalence, clinical characteristics, and in vitro studies. *BMC Med Genet.* 2013; 14: 55.
30. Tesson F, Saj M, Uvaize MM, i wsp. Lamin A/C mutations in dilated cardiomyopathy. *Cardiol J.* 2014; 21: 331-342.
31. Kumar S, Baldinger SH, Gandjbakhch E, i wsp. Long-Term Arrhythmic and Nonarrhythmic Outcomes of Lamin A/C Mutation Carriers. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 68: 2299-2307.
32. Nakajima K, Aiba T, Makiyama T, i wsp. Clinical Manifestations and Long-Term Mortality in Lamin A/C Mutation Carriers From a Japanese Multicenter Registry. *Circ J.* 2018; 82: 2707-2714.
33. Nishiuchi S, Makiyama T, Aiba T, i wsp. Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in LMNA Mutation Carriers. *Circ Cardiovasc Genet.* 2017; 10.
34. Captur G, Arbustini E, Bonne G, i wsp. Lamin and the heart. *Heart.* 2018; 104: 468-479.
35. Wahbi K, Ben Yaou R, Gandjbakhch E, i wsp. Development and Validation of a New Risk Prediction Score for Life-Threatening Ventricular Tachyarrhythmias in Laminopathies. *Circulation.* 2019; 140: 293-302.

36. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, i wsp. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *The New England journal of medicine*. 1999; 341: 1715-1724.
37. Maraldi NM, Capanni C, Cenni V, i wsp. Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *J Cell Biochem*. 2011; 112: 979-992.
38. Chen SN, Mestroni L, Taylor MRG. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2021; 36: 288-294.
39. Peters S, Kumar S, Elliott P, i wsp. Arrhythmic Genotypes in Familial Dilated Cardiomyopathy: Implications for Genetic Testing and Clinical Management. *Heart Lung Circ*. 2019; 28: 31-38.
40. Gerull B, Gramlich M, Atherton J, i wsp. Mutations of TTN, encoding the giant muscle filament titin, cause familial dilated cardiomyopathy. *Nat Genet*. 2002; 30: 201-204.
41. Eldemire R, Tharp CA, Taylor MRG, i wsp. The Sarcomeric Spring Protein Titin: Biophysical Properties, Molecular Mechanisms, and Genetic Mutations Associated with Heart Failure and Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*. 2021; 23: 121.
42. Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 31-46.
43. Haas J, Frese KS, Peil B, i wsp. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015; 36: 1123-1135a.
44. Ware JS, Li J, Mazaika E, i wsp. Shared Genetic Predisposition in Peripartum and Dilated Cardiomyopathies. *N Engl J Med*. 2016; 374: 233-241.
45. Ware JS, Amor-Salamanca A, Tayal U, i wsp. Genetic Etiology for Alcohol-Induced Cardiac Toxicity. *J Am Coll Cardiol*. 2018; 71: 2293-2302.
46. Garcia-Pavia P, Kim Y, Restrepo-Cordoba MA, i wsp. Genetic Variants Associated With Cancer Therapy-Induced Cardiomyopathy. *Circulation*. 2019; 140: 31-41.
47. Felkin LE, Walsh R, Ware JS, i wsp. Recovery of Cardiac Function in Cardiomyopathy Caused by Titin Truncation. In: *JAMA Cardiol*. 2016: 234-235.
48. Roberts AM, Ware JS, Herman DS, i wsp. Integrated allelic, transcriptional, and phenomic dissection of the cardiac effects of titin truncations in health and disease. *Sci Transl Med*. 2015; 7: 270ra276.

49. Tayal U, Newsome S, Buchan R, i wsp. Truncating Variants in Titin Independently Predict Early Arrhythmias in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2017; 69: 2466-2468.
50. Nakamura H, Niwano S, Fukaya H, i wsp. Cardiac troponin T as a predictor of cardiac death in patients with left ventricular dysfunction. *J Arrhythm*. 2017; 33: 463-468.
51. Aimo A, Januzzi JL, Jr., Vergaro G, i wsp. Prognostic Value of High-Sensitivity Troponin T in Chronic Heart Failure: An Individual Patient Data Meta-Analysis. *Circulation*. 2018; 137: 286-297.
52. Berger R, Huelsman M, Strecker K, i wsp. B-type natriuretic peptide predicts sudden death in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2002; 105: 2392-2397.
53. Scott PA, Barry J, Roberts PR, i wsp. Brain natriuretic peptide for the prediction of sudden cardiac death and ventricular arrhythmias: a meta-analysis. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11: 958-966.
54. Levine YC, Rosenberg MA, Mittleman M, i wsp. B-type natriuretic peptide is a major predictor of ventricular tachyarrhythmias. *Heart Rhythm*. 2014; 11: 1109-1116.
55. Akhtar M, Elliott PM. Risk Stratification for Sudden Cardiac Death in Non-Ischaemic Dilated Cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rep*. 2019; 21: 155.
56. Sammani A, Kayvanpour E, Bosman LP, i wsp. Predicting sustained ventricular arrhythmias in dilated cardiomyopathy: a meta-analysis and systematic review. *ESC Heart Fail*. 2020.
57. Dziewięcka E, Gliniak M, Winiarczyk M, i wsp. Mortality risk in dilated cardiomyopathy: the accuracy of heart failure prognostic models and dilated cardiomyopathy-tailored prognostic model. *ESC Heart Fail*. 2020; 7: 2455-2467.
58. Rapezzi C, Arbustini E, Caforio AL, i wsp. Diagnostic work-up in cardiomyopathies: bridging the gap between clinical phenotypes and final diagnosis. A position statement from the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2013; 34: 1448-1458.
59. McKie PM, AbouEzzeddine OF, Scott CG, i wsp. High-sensitivity troponin I and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide predict heart failure and mortality in the general population. *Clin Chem*. 2014; 60: 1225-1233.
60. Wess G, Domenech O, Dukes-McEwan J, i wsp. European Society of Veterinary Cardiology screening guidelines for dilated cardiomyopathy in Doberman Pinschers. *J Vet Cardiol*. 2017; 19: 405-415.

61. Grzybowski J, Bilinska ZT, Janas J, i wsp. Plasma concentrations of N-terminal atrial natriuretic peptide are raised in asymptomatic relatives of dilated cardiomyopathy patients with left ventricular enlargement. *Heart*. 2002; 88: 191-192.
62. Tavgigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, i wsp. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med*. 2018; 20: 1054-1060.
63. Pugh TJ, Kelly MA, Gowrisankar S, i wsp. The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med*. 2014; 16: 601-608.
64. Akinrinade O, Koskenvuo JW, Alastalo TP. Prevalence of Titin Truncating Variants in General Population. *PLoS One*. 2015; 10: e0145284.
65. Bondue A, Arbustini E, Bianco A, i wsp. Complex roads from genotype to phenotype in dilated cardiomyopathy: scientific update from the Working Group of Myocardial Function of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res*. 2018; 114: 1287-1303.
66. Jacoby D, McKenna WJ. Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2012; 33: 296-304.
67. Begay RL, Graw SL, Sinagra G, i wsp. Filamin C Truncation Mutations Are Associated With Arrhythmogenic Dilated Cardiomyopathy and Changes in the Cell-Cell Adhesion Structures. *JACC Clin Electrophysiol*. 2018; 4: 504-514.
68. Ortiz-Genga MF, Cuenca S, Dal Ferro M, i wsp. Truncating FLNC Mutations Are Associated With High-Risk Dilated and Arrhythmogenic Cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2016; 68: 2440-2451.
69. Smith ED, Lakdawala NK, Papoutsidakis N, i wsp. Desmoplakin Cardiomyopathy, a Fibrotic and Inflammatory Form of Cardiomyopathy Distinct From Typical Dilated or Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Circulation*. 2020; 141: 1872-1884.
70. van den Hoogenhof MMG, Beqqali A, Amin AS, i wsp. RBM20 Mutations Induce an Arrhythmogenic Dilated Cardiomyopathy Related to Disturbed Calcium Handling. *Circulation*. 2018; 138: 1330-1342.
71. Stege NM, de Boer RA, van den Berg MP, i wsp. The Time Has Come to Explore Plasma Biomarkers in Genetic Cardiomyopathies. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.
72. Pasotti M, Klersy C, Pilotto A, i wsp. Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52: 1250-1260.

73. Captur G, Arbustini E, Syrris P, i wsp. Lamin mutation location predicts cardiac phenotype severity: combined analysis of the published literature. *Open Heart*. 2018; 5: e000915.
74. Choi SH, Weng LC, Roselli C, i wsp. Association Between Titin Loss-of-Function Variants and Early-Onset Atrial Fibrillation. *Jama*. 2018; 320: 2354-2364.
75. Haggerty CM, Damrauer SM, Levin MG, i wsp. Genomics-First Evaluation of Heart Disease Associated With Titin-Truncating Variants. *Circulation*. 2019; 140: 42-54.