



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ПЕТЯ ПЛАМЕНОВА АНГЕЛОВА

**Молекулярно-генетични характеристики при пациенти с
кардиомиопатия в България**

АВТОРЕФЕРАТ

**На дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен
„ДОКТОР“**

**Област на висше образование: 4. Природни науки, математика и
информатика
Професионално направление: 4.3. Биологически науки
Докторска програма: Молекулярна биология**

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

**Проф. Албена Първанова Годорова – Георгиева, дбн
Акад. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн**

София, 2025

Дисертационният труд съдържа 209 страници, 28 фигури и 22 таблици¹.

Цитирани са 336 литературни и 7 електронни източници.

Настоящото проучване е финансирано частично от Съвета по медицинска наука на Медицински университет – София по договори №Д-125/2021 год., №Д-184/2022 год. и №Д-325/2022 год.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита на катедрен съвет на Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София и решение на факултетен съвет - протокол № 4/19.03.2025 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 24.06.2025 г. в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински Университет - София, ул. Здраве 2, гр. София пред научно жури в състав:

Външни членове:

- Проф. д-р Светла Димитрова Петрова-Чанкова, дб – СУ „Св. Климент Охридски“
- Доц. Анастас Георгиев Господинов, дб – Българска академия на науките
- Доц. д-р Васил Бориславов Трайков, дм – Аджибадем Сити Клиник УМБАЛ „Токуда“ – рецензент

Вътрешни членове:

- Проф. Алексей Славков Савов, дб - Катедра по акушерство и гинекология на Медицински факултет, Медицински университет – София – рецензент
- Доц. Мария Димитрова Драгнева, дб - Катедра по медицинска химия и биохимия на Медицински факултет, Медицински университет – София

Резервни членове:

- Проф. Маргарита Димитрова Апостолова, дб - външен резервен член за МУ – София
- Проф. д-р Иванка Исталианова Димова, дм - вътрешен резервен член за МУ – София

Материалите по защитата са на разположение в Катедра по медицинска химия и биохимия, Медицински университет – София.

¹ Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответства на тази в дисертационния труд.

Съдържание

Използвани съкращения	4
1. ВЪВЕДЕНИЕ	5
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ	6
2.1. ЦЕЛ.....	6
2.2. ЗАДАЧИ.....	6
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ	7
3.1. МАТЕРИАЛИ	7
3.2. МЕТОДИ.....	7
4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ	8
4.1. Молекулярно-генетичен профил при изследваните индексни пациенти с кардиомиопатия.....	8
4.2. Генотип-фенотипни корелации при възрастни пациенти с ХКМП	17
4.3. Клиничен случай на пациент с <i>GTPBP3</i> -кардиомиопатия	26
4.4. Клиничен случай на пациент с ХКМП и преживян инсулт на 41-годишна възраст	37
5. ИЗВОДИ	42
6. ПРИНОСИ	43
6.1. Научно-теоретични приноси	43
6.2. Научно-приложни приноси	43
7. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ПРОЯВИ, ПРОЕКТИ И НАГРАДА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД.....	44
7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	44
7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	44
7.3. ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	45
7.4. НАГРАДА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД	45
8. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА.....	46

Използвани съкращения:

АКМП – Аритмогенна кардиомиопатия

АТФ – Аденозин трифосфат

АХ – Артериална хипертония

ВСС – Внезапна сърдечна смърт

ГТФ – Гуанозин трифосфат

ДКМП – Дилатативна кардиомиопатия

ЛК – Лява камера/левокамерна (-о, -и)

ЛКХ – Левокамерна хипертрофия

ЛНКМП – Левокамерна некомпактна кардиомиопатия

ЛП – ляво предсърдие

ПМ – Предсърдно мъждене

РКМП – Рестриктивна кардиомиопатия

СН – Сърдечна недостатъчност

ФИ – Фракция на изтласкване

ХКМП – Хипертрофична кардиомиопатия

АСМГ/АМР – Американски колеж по Медицинска Генетика и Геномика/Асоциация по Молекулярна Патология

СОХРD23 – Комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране тип 23 (Combined oxidative phosphorylation deficiency type 23)

GTPBP3 – Гуанозин трифосфат (ГТФ)-свързващ протеин 3 (GTP-binding protein 3)

ICD – Имплантируем кардиовертер дефибрилатор (Implantable cardioverter-defibrillator)

LP/P вариант – Вероятно патогенен/патогенен вариант (Likely pathogenic/pathogenic variant)

MLVWT – Максимална дебелина на стена на лява камера

NYHA – New York Heart Association

ОХРHOS – Окислително фосфорилиране

SERCA2a – Ca²⁺-АТФаза на сърдечния саркоплазмен ретикулум

VUS – Вариант с неясно значение (Variant of uncertain significance)

WES – Цялостно екзомно секвениране (Whole exome sequencing)

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Кардиомиопатиите са клинично и генетично хетерогенна група заболявания на сърцето, които се свързват със значителна заболеваемост и смъртност. Характеризират се с механична и/или електрическа дисфункция на миокарда, водеща до развитието на дилатативен, хипертрофичен, рестриктивен или аритмогенен фенотип в резултат на различни причини, които често са генетични. Генетичните основи на кардиомиопатиите се характеризират с изключително разнообразие, като са установени приблизително 100 асоциирани гени. Хипертрофичната кардиомиопатия (ХКМП) се причинява основно от мутации в саркомерните гени, аритмогенната кардиомиопатия (АКМП) – от мутации в гените за десмозомните протеини, рестриктивната кардиомиопатия (РКМП) – от мутации както в гените за саркомера, така и в цитоскелетните гени, а молекулярно-генетичните основи на дилатативната кардиомиопатия (ДКМП) включват дефекти в множество клетъчни компоненти и метаболитни пътища. Характерна особеност при тези заболявания е значителното припокриване на засегнатите гени, което представлява предизвикателство при интерпретацията на резултатите от генетичните изследвания на пациентите. Вариабилната експресия и непълната пенетрантност на кардиомиопатиите могат да бъдат обяснени с влиянието на фактори на околната среда и други регулаторни механизми върху фенотипната изява. Изясняването на генетичните причини за кардиомиопатиите може да има важно значение за пациентите и техните семейства от клинична гледна точка.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Целта на настоящия дисертационен труд е изясняване на молекулярно-генетичните характеристики на кардиомиопатиите при български пациенти и изследване на генотип-фенотипни корелации.

2.2. ЗАДАЧИ

- Изолиране на ДНК от венозна кръв на български пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия
- Секвениране от ново поколение (цялостно екзомно секвениране; WES, whole exome sequencing) на изолираната пациентска ДНК
- Анализ на данните от WES посредством специфичен софтуер
- Директно секвениране по Sanger за потвърждение на патогенните находки
- Интерпретация на резултатите за определяне на честотата на установените мутации и генетични варианти
- Статистически анализ за определяне на генотип-фенотипните корелации при пациентите с ХКМП
- Сравняване на резултатите с публикуваните данни в световната научна литература и тяхното отразяване в международните бази данни

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. МАТЕРИАЛИ

За целите на дисертационния труд бяха изследвани общо 111 пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия от България и техните роднини, както следва:

- 80 индексни пациенти и 31 роднини.

От индексните пациенти бяха изследвани 68 пациенти с ХКМП, включително 2-ма педиатрични пациента; 9 пациенти с ДКМП, от които 2-ма педиатрични пациента; 2-ма пациента с РКМП, както и 1 пациентка с неуточнена кардиомиопатия.

3.2. МЕТОДИ

- Изолиране на високомолекулна ДНК от периферна кръв по солеви метод
- Оценка на качеството на изолираната ДНК
- Секвениране от ново поколение (цялостно екзомно секвениране; WES, whole exome sequencing) на изолираната пациентска ДНК
- Анализ на данните от WES посредством специфичен софтуер
- Верифициране на находките от WES и провеждане на сегрегационни анализи в засегнатите семейства по метода на Sanger
- Интерпретация на резултатите за определяне на честотата на установените мутации и генетични варианти
- Статистически анализ за определяне на генотип-фенотипни корелации
- Сравняване на резултатите с публикуваните данни в световната научна литература и тяхното отразяване в международните бази данни

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В рамките на дисертационния труд бяха изследвани общо 111 участници, от които 80 индексни пациенти с кардиомиопатия и 31 роднини. Сегрегационни анализи по метода на директно секвениране по Sanger бяха проведени в 14 от засеганатите семейства.

4.1. Молекулярно-генетичен профил при изследваните индексни пациенти с кардиомиопатия

4.1.1. Резултати

В настоящото проучване бяха изследвани 80 индексни пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия: 68 пациенти с ХКМП, включително 2ма педиатрични пациента, 9 пациенти с ДКМП, от които 2ма педиатрични пациента, 2ма пациента с РКМП и 1 пациентка с неуточнена кардиомиопатия. Клиничните данни и резултатите от генетичните изследвания на 20 от тези пациенти са публикувани от нашата работна група в списание Българска кардиология (Ангелова и съавт., 2024).

Резултатите от проведените изследвания при 80 български пациенти показват наличието на генетични варианти при 68 от тях, като изчислената честота на установените генетични находки, която включва вероятно патогенни/патогенни (LP/P; likely pathogenic/pathogenic) варианти и VUS (variant of uncertain significance; вариант с неясно значение) в тази пациентска група е 85%. Честотата на новооткритите генетични находки, които не са докладвани в базата данни ClinVar или литературните източници, при проучваната група пациенти е ~30%. Около една четвърт от новооткритите варианти могат да бъдат класифицирани като LP/P според критериите на ACMG/AMP (Американски колеж по Медицинска Генетика и Геномика/Асоциация по Молекулярна Патология) или ~7% от всички идентифицирани находки при пациентите. Генетичните находки при изследваните пациенти могат да се класифицират, съответно като:

- LP/P варианти при 37 пациенти (~46%);
- VUS при 31 пациенти (~39%).

При 12 от проучените пациенти не се установяват генетични находки, свързани с изявената клинична симптоматика (15%), съответно: при 8 от пациентите с ХКМП, 2 от пациентите с ДКМП и при изследваните 2ма пациента с РКМП. LP/P варианти се откриват при ~44% от пациентите с ХКМП и ~67% от пациентите с ДКМП, както и при пациентката с неуточнена кардиомиопатия. Изчислената честота на LP/P варианти в изследваната група е ~31% от всички открити варианти, като честотите при пациентите с ХКМП и ДКМП са съответно ~30% и ~38%.

По отношение на типовете открити генетични варианти при всички пациенти, с най-висока честота се установяват missense варианти (~76%), а по-рядко се откриват варианти с изместване на рамката на четене и nonsense варианти (по ~7%), splice site варианти (~6%), in-frame дубликация/делеции (~2%), както и substitution, и start loss варианти (по ~1%). Честотите при пациентите с ХКМП, ДКМП и неуточнена кардиомиопатия са разпределени, както следва:

- ХКМП – missense варианти ~80%; варианти с изместване на рамката на четене и splice site варианти ~7% за всеки тип; nonsense варианти ~5%; substitution вариант и in-frame делеция ~1% за всеки тип;

- ДКМП – missense варианти ~56%; nonsense варианти ~19%; in-frame дупликация/делеция ~13%; вариант с изместване на рамката на четене и start loss вариант ~6% за всеки тип;
- неуточнена кардиомиопатия – missense вариант.

На **фигура 1** са представени получените резултати по отношение на честотата на LP/P и VUS варианти, както и само на LP/P варианти при изследваната група пациенти, а също и резултатите от анализа при подгрупите на пациентите с ХКМП и ДКМП. Получените резултати за честотата на генетичните варианти (общо LP/P и VUS варианти), установени при българските пациенти с кардиомиопатия, показват че най-често се засягат саркомерните гени (*MYBPC3*, *MYH7*, *TTN*, *TNNI3*, *TNNT2*, *MYH6*, *ACTC1*, *TRPM1*) – в повече от 40% от случаите, гени за йонни канали (*SCN5A*, *KCNA5*, *KCNH2*, *CACNA1C*, *ABCC9*, *KCNQ1*, *CACNB2*, *TRPM4*), цитоскелетни гени (*LAMA4*, *ILK*, *FLNC*, *DES*, *ACTN4*), гени за Z-диска (*TCAP*, *MYPN*, *VCL*, *ACTN2*), гени, свързани с метаболизма на калция (*PLN*, *JPH2*, *RYR2*), гени за митохондриални протеини (*TAZ*, *NDUFB11*, *POLG*, *GTPBP3*, *CPT2*), гени, свързани с лизозомната локализация и функция (*LAMP2*, *PLEKHM2*), гени, свързани с липидния метаболизъм (*APOA1*), саркомер-свързани гени (*FHOD3*, *MYLK2*, *TNNI3K*), гени на сплайсозомата (*RBM20*), гени на дистрофиновия комплекс (*SGCD*), гени на екстрацелуларния матрикс (*FBN1*), но също така и гени за клетъчно-адхезионни протеини (*CDH2*, *CTNNA3*), десмозомните структури (*DSP*, *PKP2*, *DSC2*), транскрипционни фактори (*GATA4*, *CREB3L3*, *MYRF*), клетъчен мембранен протеин (*ANK2*), моторен протеин (*DNAH11*), heat-shock протеин (*CRYAB*) и за специфични рецепторни (*LDLR*, *IL31RA*), сигнални (*HRAS*) и регулаторни (*AKAP9*, *PKD1*) молекули (**фигура 1, панел А.1**). LP/P варианти се установяват с най-висока честота в *MYBPC3* гена (29%), последвано от находките в гените за β -миозиновата тежка верига (12%), тропонин I (7%) и тропонин T (5%) (**фигура 1, панел А.2**). Резултатите от анализа за честотата на генетичните находки в подгрупата на пациентите с ХКМП показват, че 43% от откритите LP/P и VUS варианти, и ~2/3 от установените LP/P варианти засягат саркомерните гени (**фигура 1, панели В.1 и В.2**). В подгрупата на пациентите с ДКМП, LP/P и VUS варианти се установяват най-често в *TTN* гена (27%) и *TRPM4* гена (13%) (**фигура 1, панел С.1**). LP/P варианти при пациентите с ДКМП се откриват в гени за протеини, участващи в саркомерната, цитоскелетната и десмозомната структура, както и във функцията на митохондрияте (**фигура 1, панел С.2**). При изследваната пациентка с неуточнена кардиомиопатия открихме патогенен вариант в гена за тропонин I.

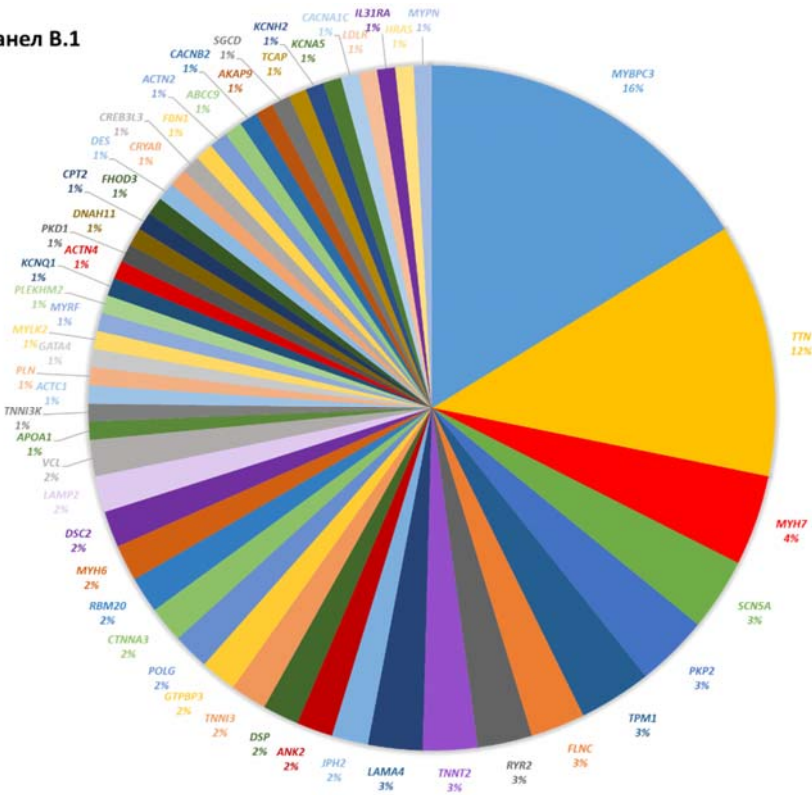
Клетъчните компоненти, които са засегнати от мутациите, установени при изследваните пациенти в рамките на дисертационния труд, са представени на **фигура 2**.

На **фигура 3** са представени резултатите от проведените сегрегационни анализи при 13 от засегнатите семейства в настоящето проучване. Получените резултати от сегрегационния анализ в семейството при пациент №1 са представени подробно в т. 4.3. **Клиничен случай на пациент с GTPBP3-кардиомиопатия.**

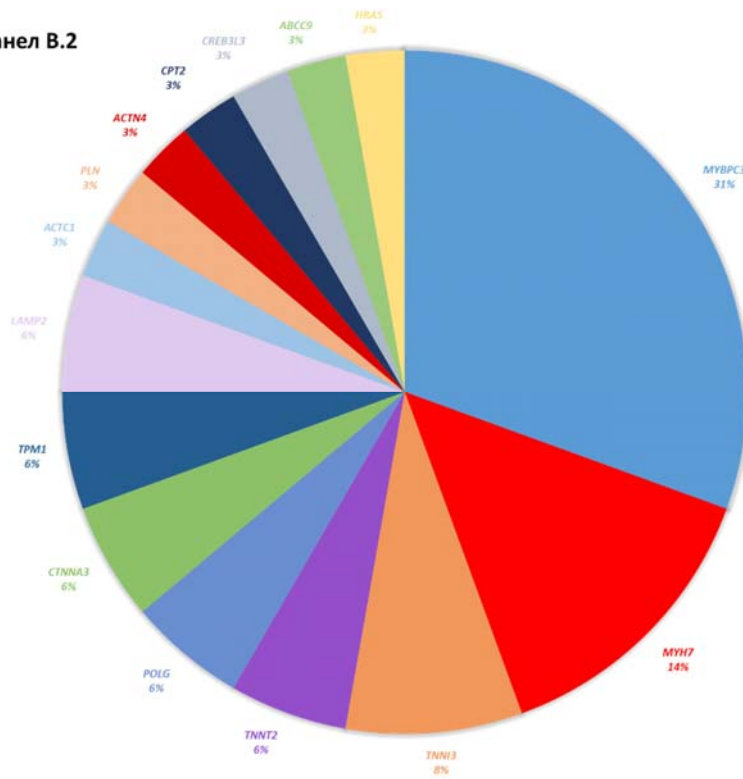
4.1.2. Обсъждане

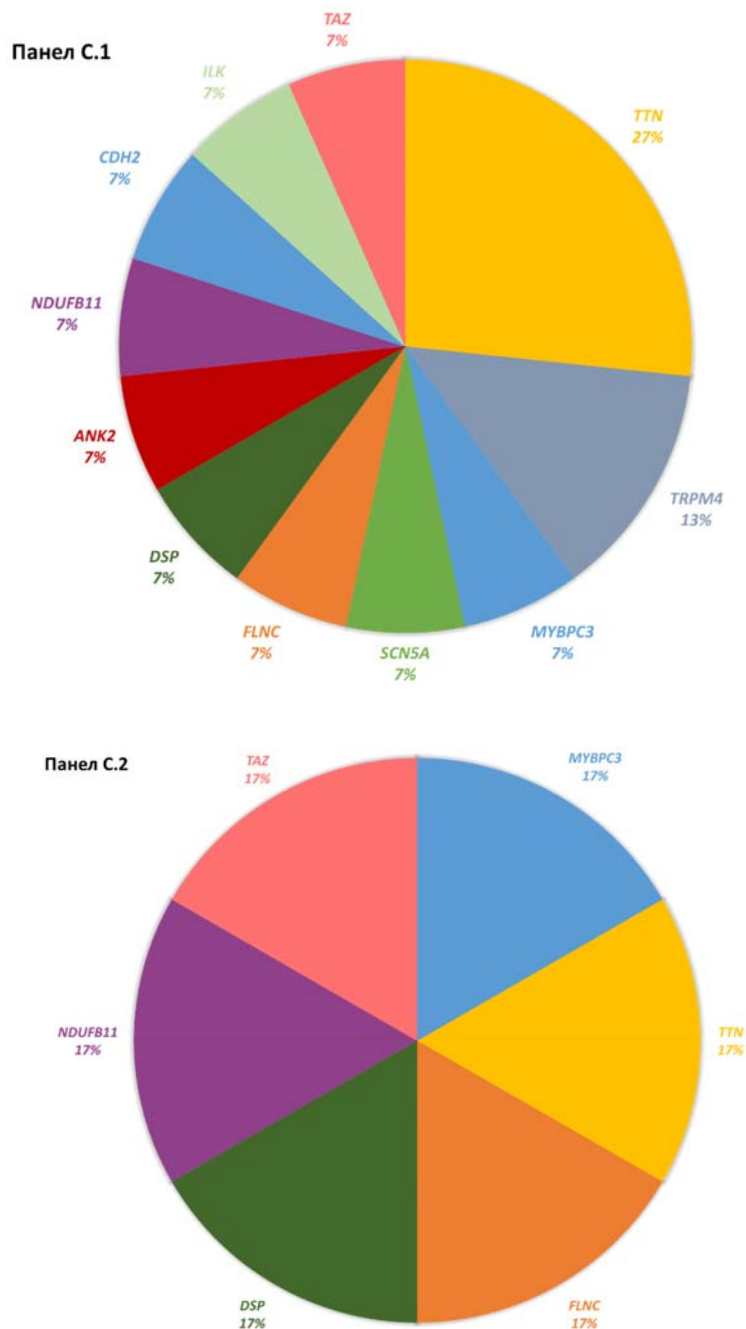
В изследваната група от 80 пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия в България, установената честота на LP/P и VUS варианти е 85%, която е по-висока в сравнение с докладваните в литературата данни, като при ~44% от пациентите с ХКМП и ~67% от пациентите с ДКМП се откриват LP/P варианти, както и при пациентката с неуточнена кардиомиопатия. В проучване, проведено от Alfares и съавт. при 2912 пациенти с ХКМП с приложението на директно секвениране по Sanger на 10 или 11 гени,

Панел В.1



Панел В.2

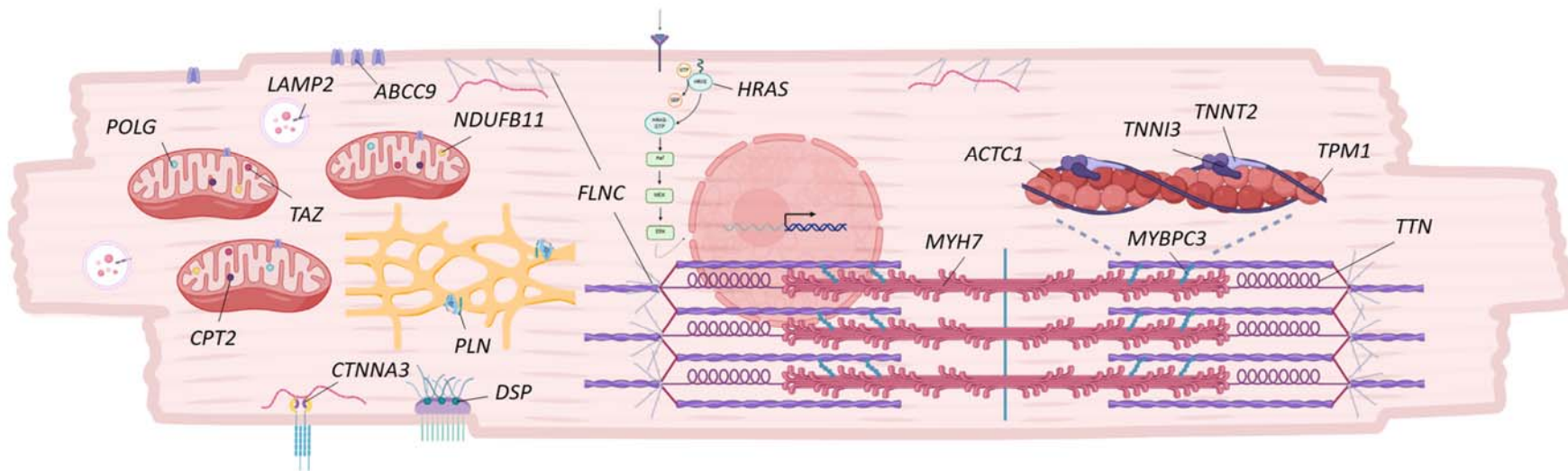




Фигура 1. Честота на вероятно патогенни/патогенни варианти (LP/P) и варианти с неясно значение (VUS), както и на LP/P варианти при изследваните пациенти. Резултатите по отношение на честотата на LP/P и VUS варианти (панел А.1, панел В.1 и панел С.1) и LP/P варианти (панел А.2, панел В.2 и панел С.2) при всички изследвани пациенти в проучването са представени на панел А, в подгрупата на пациентите с хипертрофична кардиомиопатия на панел В, а в подгрупата на пациентите с дилатативна кардиомиопатия на панел С.

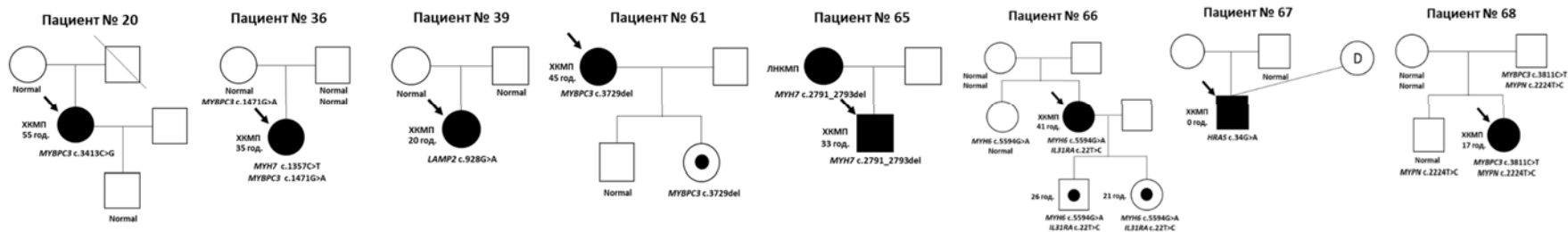
Използвани съкращения: LP/P, вероятно патогенен/патогенен; VUS, вариант с неясно значение.

или секвениране от ново поколение с таргетен панел от 18, 46 или 51 гени, положителни генетични находки са докладвани при ~32% от пациентите в проучването, а непотвърдени резултати при допълнителни ~15% от тях (Alfares et al., 2015). Данните от

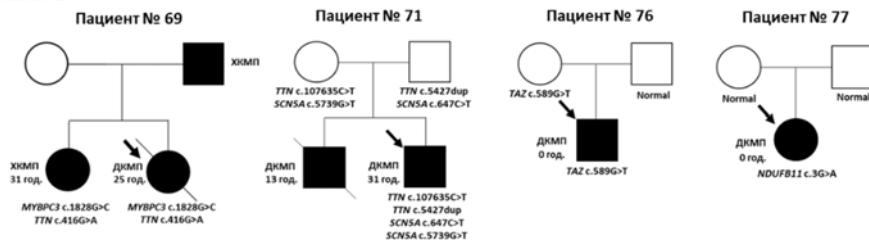


Фигура 2. Клетъчни компоненти, които са засегнати от мутациите, установени при изследваните пациенти. Вероятно патогенни/патогенни варианти, открити в изследваната пациентска група, засягат саркомерната (*MYH7*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *TNNI3*, *TPM1*, *ACTC1*, *TTN*), цитоскелетната (*FLNC*), десмозомната (*DSP*) и клетъчно-адхезионната (*CTNNA3*) структури, както и митохондриални протеини (*TAZ*, *NDUFB11*, *CPT2*, *POLG*), йонен канал (*ABCC9*), лизозомен мембранно-асоцииран протеин (*LAMP2*), протеин, свързан с калциевия метаболизъм (*PLN*) и протеин, участващ в клетъчната сигнализация (*HRAS*).

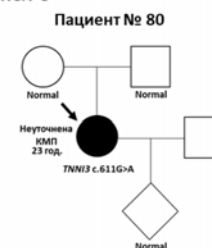
Панел А



Панел В



Панел С



Фигура 3. Резултати от сегрегационните анализи, проведени в семействата при изследваните пациенти в рамките на дисертационния труд. Резултатите от сегрегационните анализи, проведени в семействата при пациентите с хипертрофична кардиомиопатия (ХКМП) са представени на **панел А** (пациенти №20, 36, 39, 61, 65, 66, 67 и 68), при пациентите с дилатативна кардиомиопатия (ДКМП) – на **панел В** (пациенти №69, 71, 76 и 77), а при пациентка с неуточнена кардиомиопатия (КМП) – на **панел С** (пациент №80).

Използвани съкращения: Год., години; ДКМП, дилатативна кардиомиопатия; КМП, кардиомиопатия; ЛНКМП, левокамерна некомпактна кардиомиопатия; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия.

голямо изследване при 4591 пациенти с ХКМП, от които 2763 генотипирани, показват наличието на LP/P и VUS варианти в саркомерните гени при съответно 46,3% и 9,5% от пациентите (Ho et al., 2018). Резултатите от проучване, проведено при 766 пациенти с ДКМП, показват че положителни генетични находки се установяват при около 37% от изследваните пациенти, като честотата на непотвърдени случаи (случаи само с VUS) се увеличава от 4.6-6.5% до 51-61% с увеличаването на размера на тестовия панел от 5 до 46 гени, което се дължи основно на вариантите, открити в гена за титин, добавен в по-големия панел (Pugh et al., 2014). Данните от проведено изследване при 151 педиатрични пациенти с кардиомиопатия (66 пациенти с ХКМП, 64 пациенти с ДКМП, 8 пациенти с РКМП и 13 пациенти с левокамерна некомпактна кардиомиопатия (ЛНКМП)) с приложението на таргетен или разширен панел от съответно 47 или 104 гени, показват, че положителни генетични находки се установяват при 26% от пациентите, 42% имат открити само VUS, а 32% имат отрицателни резултати (Ouellette et al., 2018). Докладвана е по-висока честота на откритите VUS с приложението на разширен спрямо таргетен панел (87% спрямо 30%, $P < 0.0001$). Високата честота на положителни генетични находки при проучваната група пациенти може да бъде обяснена с избора на метод за изследване – WES и провеждането на молекулярно-генетичен анализ с приложението на разширен панел от 242 гени, свързани с кардиомиопатия, както и приложението на допълнителни таргетни панели от 20 гени, асоциирани с наследствена амилоидоза при двама от пациентите, от 496 гени, асоциирани с нефрологични заболявания при 1 пациент и от 467 гени, асоциирани с невромускулни заболявания при 1 пациент. Друга важна предпоставка за получения резултат е извършването на детайлна клинична оценка, включваща данните за фамилна анамнеза от лекуващите лекари при определянето на пациенти за насочване за генетично изследване. Приблизително 1/4 от пациентите, включени в рамките на дисертационния труд имат фамилна анамнеза за внезапна сърдечна смърт (ВСС) или кардиомиопатия – ~24% от пациентите с ХКМП и ~56% от пациентите с ДКМП; пациентката с неуточнена кардиомиопатия има отрицателна фамилна анамнеза. Според данните в литературните източници, LP/P варианти при пациентите с ХКМП се установяват при ~60% от фамилните и ~30% от спорадичните случаи, докато при пациентите с ДКМП положителни генетични находки са докладвани при 25-40% от пациентите с фамилна анамнеза за заболяването и при 10-30% от тези без данни за фамилна анамнеза (Heidenreich et al., 2022; Ommen et al., 2020). За разлика от публикуваните литературни данни, получените резултати при българските пациенти показват, че LP/P варианти се откриват при ~46% от пациентите с ХКМП без данни за фамилна анамнеза, при ~53% от пациентите с ХКМП с данни за фамилна анамнеза, както и при 1/2 от пациентите със спорадична ДКМП, а честотата достига 80% при пациентите с ДКМП с положителна фамилна анамнеза. Наличието на две или три патогенни мутации в един или повече гени при пациенти с ХКМП е докладвано рядко - при съответно 5% и 0.8% от случаите, докато данните от проучване при европейски пациенти със спорадична или фамилна ДКМП показват, че голяма част от пациентите са двойни хетерозиготи по един (7%) или по различни гени (38%), както и че 12,8% от пациентите са носители на 3 или повече варианти (Girolami et al., 2010; Naas et al., 2015; Ingles et al., 2005). В изследваната група повече от 1 LP/P генетични варианти се установяват при ~3% от пациентите с ХКМП и при нито един от пациентите с ДКМП. Тези разлики могат да се дължат на малкия брой изследвани пациенти, специално в групата на пациентите с ДКМП. В съответствие с литературните данни, установените варианти при българските пациенти с кардиомиопатия, представляват редки варианти, които се откриват при единични пациенти или фамилии (Alfares et al., 2015; Marian and Braunwald, 2017; Norton et al., 2012). При изследваните пациенти с РКМП в настоящото проучване не се установяват генетични варианти. РКМП представлява рядка кардиомиопатия, като

данните показват, че генетични находки вероятно могат да се установят при максимално 60% от случаите, което може да обясни получения резултат при двамата анализирани пациенти (Wilde et al., 2022).

Приблизително 90% от патогенните мутации, които причиняват ХКМП, според литературните данни, са missense мутации (Marian and Braunwald, 2017). Инсерции/делеции и мутации, водещи до промяна в рамката на четене са докладвани при *MYBPC3* гена, както и редки случаи на делеции в гените *MYH7* и *TNNT2*. В проучване, проведено от Norton и съвт. е докладвано, че ~90% от вариантите, установени при пациенти с фамилна или спорадична ДКМП, представляват единични нуклеотидни замени (93% missense, 5% nonsense, и 2% splice site варианти), а ~10% от тях са инсерции/делеции с размер 1 до 4 бази, водещи до изместване на рамката на четене в кодиращите последователности при 86% от случаите (Norton et al., 2012). Разпределението по типове варианти в проучваната група пациенти показва, че се установява съответно 2 и 4,5 пъти по-висока честота на преждевременно терминаращи варианти в сравнение с честотите, докладвани в литературата, както при пациентите с ХКМП, така и при пациентите с ДКМП. Въпреки този висок процент, missense мутациите остават водещи, като се откриват по-често и в двете пациентски подгрупи. По-голямата част от LP/P преждевременно терминаращи варианти при пациентите с ХКМП от изследваната група се откриват в *MYBPC3* гена. Докато данните от голямо проведено проучване при 4756 пациенти с ХКМП показват, че не се установява статистически значима разлика по отношение на фенотипа и тежестта на заболяването, както и нежеланите събития в зависимост от типа мутация в *MYBPC3* гена, изясняването на засегнатия ген и типа мутация може да има важно клинично значение при определени пациенти с ДКМП по отношение на оценката на риска от аритмии (Helms et al., 2020). Данните от проучване, проведено с участието на 487 пациенти с ДКМП, показват, че генетичните варианти в десмозомните гени, включително *DSP* гена, се свързват с висок риск от ВСС или животозастрашаващи аритмии (ВСС/камерна тахикардия/камерно мъждене), подобно на мутациите в *LMNA* гена, независимо от тежестта на ЛК дисфункция (Gigli et al., 2019). От друга страна, преждевременно терминаращи мутации в гена за филамин С с висока пенетрантност са докладвани при семейства с аритмогенна ДКМП и висока честота на ВСС (Begay et al., 2016, 2018). Данните от голямо проучване при 1150 пациенти с кардиомиопатия (700 ХКМП, 300 ДКМП, 50 РКМП и 100 ЛНКМП), показват, че преждевременно терминаращи мутации във *FLNC* гена са открити само при пациентите с ДКМП, докато missense или in-frame инсерции/делеции се свързват с другите фенотипове (Ader et al., 2019). При носителите на преждевременно терминаращи варианти е установена значимо по-висока честота на ВСС или фамилна анамнеза за ВСС спрямо носителите на missense мутации (70% спрямо 19%, $P = 0.01$).

При пациентите с ХКМП в нашата група, с най-висока честота се откриват LP/P варианти в *MYBPC3* (31%) и *MYH7* (14%) гените, а ДКМП се характеризира с разнообразен генетичен профил, като данните показват, че *TTN* генът се засяга в ~1/5 от случаите, което най-общо е в съответствие с докладваните литературни данни (Akhtar and Elliott, 2018; Hershberger et al., 2013). Разликите в честотите в сравнение с литературните източници за останалите установени LP/P находки може да се обясни с относително малкия брой изследвани пациенти в двете подгрупи.

В подгрупите на пациентите с ХКМП и с ДКМП, съответно, генетичните находки в *HRAS* гена, кодиращ ключов протеин от HRAS-сигналната каскада, както и в *NDUFB11* и *TAZ* гените, кодиращи протеини със специфична роля в митохондриалния метаболизъм, се свързват с тежка клинична изява при педиатрични пациенти в първите дни на постнаталния период. Интересно е, че в литературата е докладвана мутацията

c.253insC, p.Arg85ProfsTer54 в *TAZ* гена при момче и момиче с ЛК некомпактност и хипотония от България (Avdjieva-Tzavella DM et al., 2016). При момчето са съобщени също така наличие на интермитентна неутропения и на повишени нива на 3-метилглутаконова и 3-метилглутарова киселина в урината. В тази връзка, провеждането на генетични изследвания и изясняването на генетичната диагноза при тези пациенти може да има ключово значение за определяне хода и прогнозата на заболяването, клиничното поведение и терапевтичната стратегия, както и риска от унаследяване в семейството.

Интересно е да се отбележи, че резултатите от проведения сегрегационен анализ в семейството при пациент № 65, диагностициран с ХКМП, потвърждават наличието на варианта c.2791_2793del в *MYH7* гена в хетерозиготно състояние при неговата майка с ЛНКМП. Директното секвениране по Sanger при пациент №69 с ДКМП доведе до потвърждаване на варианта c.1828G>C в *MYBPC3* гена в хетерозиготно състояние и c.416G>A в *TTN* гена в хомозиготно състояние. Резултатите от сегрегационния анализ в семейството показват, че сестрата на пациентката, диагностицирана с ХКМП, е носител и на двата идентифицирани генетични варианта. При техния баща с ХКМП не е проведено генетично изследване.

Получените резултати в рамките на настоящия дисертационен труд с приложението на WES и провеждането на молекулярно-генетичен анализ при 80 български пациенти с кардиомиопатия показват наличието на генетични находки при 85% от изследваните участници. При проучваната група пациенти се установява висока честота на новооткрити варианти, които не са докладвани в базата данни ClinVar или литературните източници, която достига ~30%, като около 1/4 от тези варианти могат да бъдат класифицирани като LP/P. LP/P варианти се установяват при 37 от изследваните пациенти (~46%), докато при 12 (15%) не се откриват генетични находки, свързани с изявената клинична симптоматика. В проучваната група се установява съответно 2 и 4,5 пъти по-висока честота на преждевременно терминиращи варианти в сравнение с докладваните около 10% в литературата, както при пациентите с ХКМП, така и при пациентите с ДКМП. Важно е да се отбележи, че при пациенти с ДКМП, изясняването на засегнатия ген и типа мутация може да има важно клинично значение по отношение на оценката на риска от аритмии. При пациентите с ХКМП в изследваната група, с най-висока честота се откриват LP/P варианти в *MYBPC3* (31%) и *MYH7* (14%) гените, докато ДКМП се характеризира с разнообразен генетичен профил. Генетичните варианти, установени в *HRAS*, *NDUFB11* и *TAZ* гените, се свързват с тежка клинична изява в първите дни на постнаталния период.

4.2. Генотип-фенотипни корелации при възрастни пациенти с ХКМП

4.2.1. Резултати

За да изследваме генотип-фенотипните корелации при пациенти с кардиомиопатия от България, проведохме статистически анализ за сравнение на клиничните характеристики при най-голямата проучвана група в рамките на дисертационния труд - възрастните пациенти, диагностицирани с ХКМП, която включва 66 участници. По-голямата част от пациентите са мъже (~65% от участниците), като средната възраст е ~49 години (диапазон от 18 до 76 години). Повечето от изследваните пациенти са от български етнос (4/5 от тях), но са изследвани и пациенти от турски, ромски и арменски етнос. При ~74% от пациентите се установява обструктивна ХКМП,

като ~55% от тях са били подложени на алкохолна аблация или реаблация на септума, или миектомия. Приблизително 15% от пациентите имат имплантиран ICD (имплантируем кардиовертер дефибрилатор), а ~20% имат поставен пейсмейкър. Асиметрична левокамерна хипертрофия (ЛКХ) се открива при по-голямата част от изследваните пациенти – при ~73%, докато ~9% имат данни за деснокамерна хипертрофия. При изследваната група пациенти, средната дебелина на междукамерната преграда е 20.41 mm (диапазон 14-32 mm), средната дебелина на задна стена на лява камера (ЛК) е 14.71 mm (диапазон 9-26 mm), средната фракция на изтласкване (ФИ) е 61.24% (диапазон 44-79%), средният теледиастолен обем е 94.03 ml (диапазон 47-198 ml), средният телесистолен обем е 37.24 ml (диапазон 12-105 ml), като диастолна дисфункция се установява при ~38% от пациентите, а средният размер на лявото предсърдие е 46.55 mm (диапазон 30-64 mm). Наличието на митрална регургитация се установява при ~85% от пациентите, симптоматична сърдечна недостатъчност (СН) - при ~65% от тях, артериална хипертония (АХ) - при ~61%, докато предсърдно мъждене (ПМ) се открива при ~26%. Средната възраст на откриване на заболяването в изследваната група е 44.06 години (диапазон 18-67 години). Позитивна фамилна анамнеза за кардиомиопатия или ВСС е установена при ~25% от пациентите.

Резултатите показват, че генетични находки, включително LP/P и VUS варианти се откриват при ~88% от участниците (58 пациенти), LP/P варианти – при ~42% от участниците (28 пациенти), като по-голямата част от LP/P вариантите са установени в саркомерни гени - при ~33% от участниците (22 пациенти). Генетични находки във връзка с изявената клинична симптоматика не се откриват при ~12% от пациентите (8 участници). Изчислената честота на новооткрити генетични варианти в изследваната пациентска група е ~31%.

За целите на статистическия анализ, създадохме 3 групи на сравнение – пациенти с LP/P варианти или VUS спрямо пациенти без открити генетични находки; пациенти с LP/P варианти спрямо пациенти без открити генетични находки и пациенти с LP/P варианти само в саркомерни гени спрямо пациенти без открити генетични находки. Обобщените данни от проведенния статистически анализ са представени в **таблица 1**.

Таблица 1. Генотип-фенотипни корелации при проучваните възрастни пациенти с хипертрофична кардиомиопатия (ХКМП)

Пациенти с LP/P + VUS варианти спрямо негативни	Пациенти с LP/P варианти спрямо негативни	Пациенти с LP/P варианти в саркомерни гени спрямо негативни
ХКМП, тип		
p=1.00	p=1.00	p=1.00
Дебелина на междукамерна преграда (mm)		
p=0.9835	p=0.4564	p=0.4963

Дебелина на задна стена на лява камера (mm)		
p=0.3085	p=0.2066	p=0.3659
Фракция на изтласкване на лява камера (%)		
p=0.6004	p=0.9389	p=0.9544
Теледиастолен обем на лява камера (ml)		
p=0.9344	p=0.58	p=0.6939
Телесистолен обем на лява камера (ml)		
p=0.9199	p=0.5598	p=0.666
Ляво предсърдие, предно-заден размер (mm)		
p=0.4091	p=0.9944	p=0.8378
Възраст на откриване на заболяването, години		
p=0.1588	p=0.00002434*	p=0.00002063*

Пациент №22 е анализиран в групата на пациентите, носители на VUS.

*Статистически значимите разлики при сравненията се запазват и след приложението на тест за множество сравнение (multiple comparisons test; $p < 0.0071$).

Използвани съкращения: LP/P, вероятно патогенен/патогенен; VUS, вариант с неясно значение; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия.

Резултатите от проведения анализ показват, че не се установяват статистически значими разлики между групите на сравнение по отношение на типа ХКМП, дебелината на междукамерна преграда, дебелината на задна стена на ЛК, ФИ на ЛК, теледиастоления и телесистоления обем, както и размера на ляво предсърдие (ЛП), но открихме статистически значима разлика по отношение на по-ранна възраст на откриване на заболяването при сравнението на пациентите с открити LP/P варианти (32.96 ± 4.21 години спрямо 55.38 ± 9.57 години, 95% CI, \pm SD; $p = 2.434 \times 10^{-5}$) и пациентите с LP/P варианти в саркомерните гени (32.63 ± 4.29 години спрямо 55.38 ± 9.57 години, 95% CI, \pm SD; $p = 2.063 \times 10^{-5}$) спрямо пациентите без открити генетични находки.

Резултатите от статистическия анализ, изключващ данните на пациенти №10 и №60, при които се откриват генетични варианти, които не могат напълно да обяснят изявената клинична симптоматика, са в съответствие с данните от основния анализ.

В **таблица 2** са представени резултатите от проведените сравнения по отношение на останалите изследвани клинични характеристики между групите според наличието и типа на идентифицирани генетични находки.

Таблица 2. Сравнение на изследваните клиничните характеристики според наличието и типа на идентифицирани генетични находки при проучваните възрастни пациенти с хипертрофична кардиомиопатия

Клинични характеристики при пациентите	Пациенти с LP/P + VUS варианти (58 пациенти)	Пациенти с LP/P варианти (28 пациенти)	Пациенти с LP/P варианти в саркомерни гени (22 пациенти)	Пациенти без открити генетични находки (8 пациенти)
Тип ЛК хипертрофия				
Асиметрична	70.69%	75%	86.36%	87.5%
Концентрична	22.41%	25%	13.64%	-
Апикална	3.43%	-	-	12.15%
Mid-cavity	3.43%	-	-	-
Алкохолна аблация/реаблация на септума или миектомия				
Да	53.43%	39.29%	40.91%	62.5%
Не	46.55%	60.71%	59.09%	37.5%
Имплантиран ICD				
Да	13.79%	21.43%	22.73%	25%
Не	86.21%	78.57%	77.27%	75%
Имплантиран пейсмейкър				
Да	18.97%	14.29%	13.64%	25%
Не	81.03%	85.71%	86.36%	75%

Диастолна дисфункция на лява камера, степен				
I степен	3.45%	-	-	-
II степен	8.63%	10.74%	4.55%	-
III степен	27.59%	17.86%	22.73%	25%
Не	60.34%	71.43%	72.73%	75%
Деснокамерна хипертрофия				
Да	10.34%	10.71%	9.09%	-
Не	89.66%	89.29%	90.91%	100%
Митрална регургитация, степен				
0-I степен	55.17%	50%	50%	62.5%
II-III степен	31.03%	32.14%	27.27%	12.5%
Не	13.79%	17.86%	18.18%	25%
Сърдечна недостатъчност, клас по NYHA				
Клас I	5.17%	3.57%	4.55%	12.5%
Клас II	6.9%	7.14%	9.09%	-
Клас III-IV	56.9%	42.86%	40.91%	25%
Не	31.03%	46.43%	45.45%	62.5%
Артериална хипертония, степен				
I степен	1.72%	3.57%	4.55%	-

II степен	34.48%	21.43%	22.73%	-
III степен	20.69%	14.29%	13.64%	87.5%
Не	43.10%	60.71%	59.09%	12.5%
Предсърдно мъждане, тип				
Пристъпно	13.79%	3.75%	4.55%	25%
Персистиращо	6.9%	10.71%	13.64%	-
Перманентно	5.17%	7.14%	9.09%	-
Не	74.14%	78.57%	72.73%	75%
Фамилна анамнеза за КМП или ВСС				
Да	22.22%*	28.57%	36.36%	42.86%**
Не	77.78%	71.43%	63.64%	57.14%

Пациент №22 е анализиран в групата на пациентите, носители на VUS.

*В групата са анализирани 54 пациенти, вместо 58, тъй като липсват данни за фамилна анамнеза при 4 пациенти поради различни причини.

**В групата са анализирани 7 пациенти, вместо 8, тъй като липсват сигурни данни за фамилна анамнеза при 1 пациент.

Използвани съкращения: ВСС, внезапна сърдечна смърт; ICD, имплантируем кардиовертер дефибрилатор; КМП, кардиомиопатия; ЛК, левокамерна; LP/P, вероятно патогенен/патогенен; NYHA, New York Heart Association; VUS, вариант с неясно значение; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия.

Резултатите от проведените сравнения между пациентските групи според наличието и типа установени генетични варианти показват, че при пациентите с LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени се установява само асиметричен или концентричен тип хипертрофия, докато при нито един от пациентите без открити генетични варианти не е установена концентрична ЛКХ, както и наличието на деснокамерна хипертрофия. При пациентите с LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени се установява по-ниска честота на проведена аблация/реаблация на септума или миектомия, както и на поставяне на пейсмейкър устройства, но по-висока честота на умерено тежка до тежка митрална регургитация и на симптоматична СН в сравнение с пациентите без открити генетични находки. Изглежда, че не се установяват значими разлики между групите по отношение на честотата на поставяне на ICD и наличието на диастолна дисфункция. При пациентите без установени генетични находки се установява ~5.5 пъти по-висока честота на AX III степен в сравнение с пациентите,

носителите на LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени. Също така, при пациентите без установени генетични находки се открива единствено пароксизмално ПМ за разлика от пациентите, носители на генетични варианти, при които се установява персистиращо или перманентно ПМ. В групата на пациентите без открити генетични находки се установява най-висока честота на позитивна фамилна анамнеза.

4.2.2. Обсъждане

Изясняването на генотип-фенотипните корелации при ХКМП може да представлява предизвикателство, тъй като данните от различни проучвания при пациенти с ХКМП показват, че не се установява ясна зависимост между тежестта и хода на заболяването и мутациите в саркомерните гени. Данните от епидемиологични проучвания, въпреки че са ограничени в някои региони, не показват значими корелации между наличието на генетични мутации, клиничните прояви и сърдечния фенотип при пациентски популации от целия свят. Фенотипната експресия и клиничният ход на заболяването могат да варират значително, както при пациенти, при които е установена една и съща генетична мутация, така и при родственици от едно семейство. До голяма степен това се дължи на взаимодействието на различни фактори на околната среда и други регулаторни механизми, оказващи влияние върху фенотипната изява. При изследваните възрастни пациенти с ХКМП в настоящия дисертационен труд, открихме статистически значима разлика по отношение на по-ранна възраст на откриване на заболяването при сравнението на пациентите, носители на LP/P варианти (32.96 ± 4.21 години спрямо 55.38 ± 9.57 години) и пациентите, носители на LP/P варианти в саркомерни гени (32.63 ± 4.29 години спрямо 55.38 ± 9.57 години) спрямо пациентите без идентифицирани генетични варианти, като получените резултати са в съответствие с литературните данни (Bonaventura et al., 2024; Bos et al., 2014; Gruner et al., 2013; Ho et al., 2018; Ingles et al., 2013; Lopes et al., 2015; van Driest et al., 2004). Наличието на по-голяма максимална дебелина на стена на лява камера (MLVWT) при пациентите с ХКМП, носители на мутации в саркомерни гени, в сравнение с пациентите без установени мутации е докладвано многократно в различни проучвания, както и в резултатите от публикуван мета-анализ, като разликата при сравнението на групите не достига статистическа значимост в едно проучване, проведено от Olivotto и съавт. (Bos et al., 2014; Gruner et al., 2013; Ho et al., 2018; Ingles et al., 2013; Lopes et al., 2013, 2015; Olivotto et al., 2008; van Driest et al., 2004, 2005). Данните от проучване, проведено от Gruner и съавт., показват, че се установяват статистически значими разлики по отношение на дебелината на междукамерната преграда и дебелината на задна стена на ЛК при носителите на генетични мутации спрямо пациентите без открити мутации (съответно 18 ± 5 mm спрямо 17 ± 4 mm, $P < 0.001$ и 10 ± 2 mm спрямо 11 ± 2 mm, $P < 0.001$), които не се потвърждават в изследваната пациентска група, тъй като при проведения статистически анализ не се откриват разлики при сравненията между отделните групи според генотипния статус. В съответствие с публикуваните данни в литературните източници, получените резултати от настоящето проучване показват, че не се установяват статистически значими разлики между групите на сравнение по отношение на типа ХКМП, ФИ и размера на ЛП (Bos et al., 2014; Gruner et al., 2013; Olivotto et al., 2008; van Driest et al., 2004, 2005). Въпреки това, данните от други проучвания показват, че при пациентите с ХКМП, носители на мутации, се открива по-ниска ФИ и по-голям размер на ЛП, както и по-висока честота на обструктивна ХКМП при пациентите без установени мутации (Bonaventura et al., 2024; Gruner et al., 2013; Ho et al., 2018). В нашето изследване не установихме значими разлики между групите според генотипния статус по отношение на честотата на имплантиране на ICD, което се потвърждава от някои литературни данни, докато резултатите от други проучвания показват, че при пациентите, носители на

мутации се открива по-висока честота на поставяне на ICD (Bonaventura et al., 2024; Bos et al., 2014; García-Castro et al., 2009; Ho et al., 2018; Lopes et al., 2015; Olivotto et al., 2008; van Driest et al., 2004, 2005). Интересно е да се отбележи, че при пациентите с LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени в настоящото проучване установихме по-ниска честота на проведена аблация/реаблация на септума или миектомия, както и на имплантиране на пейсмейкър устройства в сравнение с пациентите без открити генетични варианти, докато в литературата са докладвани сходни честоти между групите (Bonaventura et al., 2024; Bos et al., 2014; García-Castro et al., 2009; Olivotto et al., 2008). По-висока честота на миектомия се установява при носителите на повече от една мутация в саркомерен ген при едно проучване (van Driest et al., 2004). В проучване, проведено от Olivotto и съавт., не са докладвани разлики по отношение на клиничните и ехографските характеристики между пациентите, носители на мутации в гените за миофиламентите и пациентите, при които не се откриват генетични находки, включително наличието на обструктивна ХКМП, размера на ЛП, ФИ, както и по отношение на честотите на аблация, миектомия и поставяне на ICD по време на 5-годишното проследяване, но при пациентите, носители на мутации, се установява по-висок риск от тежка ЛК систолна и/или диастолна дисфункция ($P=0.02$) (Olivotto et al., 2008). В проучването не се установява по-висока честота на ПМ между двете групи, но се открива по-висока честота на хронично ПМ спрямо пароксизмално ПМ при пациентите, носители на мутации в гените за миофиламентите, като тези данни са в съответствие с резултатите от нашето проучване. При голямата част от изследваните пациенти с открити LP/P варианти (75%) и LP/P варианти в саркомерни гени (~86%) установихме наличието на асиметричен тип хипертрофия, като получените резултати са сходни на данните от проучване, проведено от Lopes и съавт., в което е докладвано, че при пациентите с мутации в саркомерните гени по-често се установява асиметрична отколкото концентрична или апикална хипертрофия (Lopes et al., 2015). В същото проучване е установена асоциация между наличието на мутации в *TNNI3* гена и развитието на деснокамерна хипертрофия при пациентите, докато мутации в *TNNI3* гена не се откриват при нито един от пациентите с данни за деснокамерна хипертрофия в настоящето изследване. Данните по отношение на наличието на корелация между генотипния статус и степента на митрална регургитация при пациентите с ХКМП са ограничени, но данните от едно проучване в Германия показват, че мутациите в *MYH7* гена могат да се свързват с по-висока степен на митрална регургитация, както при пациенти с ХКМП, така и пациенти с ДКМП (Waldmüller et al., 2011). При по-голяма част от пациентите без установени генетични варианти в проучването се открива наличието на АХ, като в сравнение с пациентите с LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени се установява ~5.5 пъти по-висока честота на АХ III степен. Тези резултати са в съответствие с публикуваните данни в литературата, които също така показват, че АХ има отрицателна предиктивна стойност за наличието на положителен генетичен тест при пациенти с ХКМП (Bos et al., 2014; Gruner et al., 2013). При носителите на генетични находки в нашето проучване установихме по-висока честота на симптоматична СН, включително СН клас III-IV по NYHA (New York Heart Association), в съответствие с данните от друго изследване, проведено от García-Castro и съавт., докато в литературата са публикувани и данни от други проучвания, при които не се установяват подобни разлики на изходно ниво (Bonaventura et al., 2024; García-Castro et al., 2009; Gruner et al., 2013; Olivotto et al., 2008).

Данните от редица публикувани проучвания показват, че при пациентите, носители на генетични варианти се открива по-висока честота на фамилна анамнеза за кардиомиопатия или ВСС (Bos et al., 2014; Gruner et al., 2013; Ingles et al., 2013; Lopes et al., 2015; Olivotto et al., 2008). За разлика от литературните данни, в настоящето

проучване най-висока честота на позитивна фамилна анамнеза се установява в групата на пациентите без открити генетични находки, тъй като при 3 от изследваните пациенти с данни за фамилна анамнеза за кардиомиопатия или ВСС (1 с данни за фамилна анамнеза за ХКМП и 2 с фамилна анамнеза за ВСС) не установихме генетични варианти във връзка с изявената клинична симптоматика. Трябва да се отбележи, че данните от 2 проучвания показват, че при пациентите, носители на мутации, не се установява статистически значима разлика по отношение на наличието на по-висока честота за фамилна анамнеза за ВСС (van Driest et al., 2004, 2005).

При изследваните възрастни пациенти с ХКМП от България, LP/P варианти се откриват с най-висока честота в саркомерните гени – в повече от 2/3 от случаите. В литературата са съобщени редки случаи на открити мутации в саркомерните гени при пациенти от България. Мутации в *MYH7* гена са докладвани при 4 пациенти от две български семейства с вариабилен невромускулен фенотип със или без сърдечно засягане (Atemin et al., 2021). Интересно е, че установените мутации засягат терминалния участък на LMM (light meromyosin) домена на *MYH7*, което може отчасти да обясни наблюдаваната фенотипна вариабилност при пациентите. При нито един от пациентите с установени мутации в *MYH7* гена в изследваната пациентска група не е открито невромускулно засягане. В изследваната група, установихме също така наличието на редки LP/P варианти в гените *LAMP2*, *ABCC9*, *CTNNA3* и *CPT2*. Патогенните варианти в *LAMP2* гена са доказана причина за болест на Danon [OMIM: 300257], затова генетичните изследвания имат ключова роля в съвременната клинична практика за разпознаване на генокопията на ХКМП, които могат да се свързват с различен клиничен ход и прогноза, налагащи специфичен терпапевтичен подход в сравнение с ХКМП, причинена от мутации в саркомерните гени. Данните по отношение на патогенната роля на мутациите в гените *ABCC9*, *CTNNA3* и *CPT2* при пациенти с ХКМП са ограничени. При един пациент с хипертрофия и неговата майка с ЛНКМП е докладван VUS в *ABCC9* гена (Fernlund et al., 2020). Мутацията p.Leu765del в *CTNNA3* гена е докладвана при едно семейство, като носителите на варианта са диагностицирани с АКМП (De Bartoli et al., 2017). Вариантът е докладван в комбинация с вариант в *MYH7* гена при един роднина, който не изпълнява диагностичните критерии нито за ХКМП, нито за АКМП. Мутации в *CTNNA3* и *ABCC9* гените са открити при проучване на 200 пациенти с ХКМП от Франция (Nguyen et al., 2019). В литературата са описани случаи на хомозиготни носители на дефекти в *CPT2* гена, свързани с ХКМП или ДКМП, но асоциацията на хетерозиготните мутации в *CPT2* гена и ХКМП не е добре изяснена (Bonnefont et al., 2004; Joshi et al., 2014; Wieser, 2004). Мутация в *CPT2* гена е съобщена при пациентка с рак на гърдата и перипартална кардиомиопатия (Pfeffer et al., 2019).

LP вариантът p.Pro99Leu в *ACTN4* гена, който открихме при пациент №22, представлява интересна находка. При анализа на данните от WES беше приложен допълнителен панел от гени, включително *ACTN4* гена, свързани с нефрологични заболявания, тъй като пациентът е с вродена анатомична аномалия на отделителната система. Установено е, че въпреки че почти не се експресира в сърдечната тъкан на възрастни хора, ACTN-4 се открива и участва в ремоделирането на кардиомиоцитите при пациенти с ДКМП (Cetinkaya et al., 2020). Необходими са допълнителни данни от проучвания за изясняване на възможната роля на *ACTN4* в патогензата на ХКМП.

При двама от изследваните пациенти в групата, установихме наличието на 2 LP/P варианти (пациенти №1 и №2). Пациентските случаи са описани подробно в т. 4.3. **Клиничен случай на пациент с GTPBP3-кардиомиопатия** (пациент №1) и т. 4.4.

Клиничен случай на пациент с ХКМП и преживян инсулт на 41-годишна възраст (пациент №2).

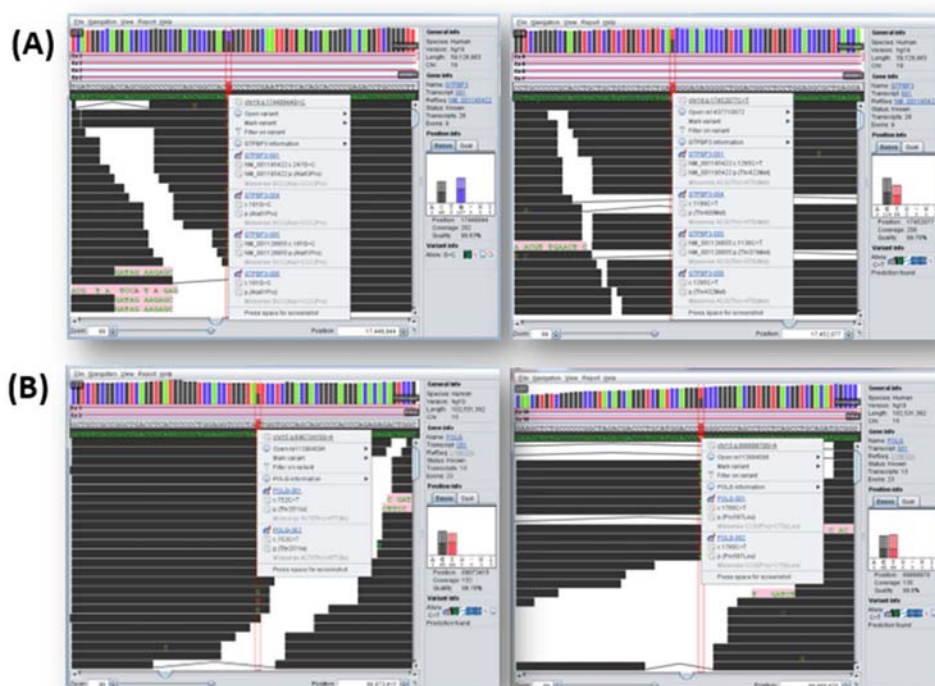
ХКМП е клинично и генетично хетерогенно заболяване, затова данните от проучвания на специфични пациентски популации могат да се различават значително, което е в подкрепа на провеждането на изследвания за изясняване на налични корелации. Получените резултати от настоящето проучване предоставят данни по отношение на генотип-фенотипните корелации при пациенти с ХКМП от България, които показват, че се установява статистически значима разлика по отношение на по-ранна възраст на откриване на заболяването при сравнението на пациентите, носители на LP/P варианти (32.96 ± 4.21 години спрямо 55.38 ± 9.57 години) и пациентите, носители на LP/P варианти в саркомерни гени (32.63 ± 4.29 години спрямо 55.38 ± 9.57 години) спрямо пациентите без открити генетични находки. Наличието на AX се установява при 87.5% от пациентите без установени генетични варианти, като в сравнение с пациентите с LP/P варианти и LP/P варианти в саркомерни гени се установява ~5.5 пъти по-висока честота на AX III степен. В съвременната клинична практика при пациентите с ХКМП, генетичните изследвания имат ключова роля за разпознаване на генокопията на ХКМП, както и за провеждането на каскаден скрининг за установяване на близки родственици в риск от развитие на заболяването при засегнатите семейства. Основни ограничения на проучването са липсата на данни от дългосрочно проследяване на изследваните пациенти с ХКМП, както и малкият брой анализирани пациенти, при които не се установяват генетични варианти. Данните от недобре проучени пациентски популации от различни региони в света могат да допринесат за характеризирането на комплексния генетичен профил на ХКМП.

4.3. Клиничен случай на пациент с *GTPBP3*-кардиомиопатия

4.3.1. Резултати

Пациент №1 е мъж на 25-годишна възраст с ХКМП, преексцитация и фасцикуло-вентрикуларна допълнителна проводна връзка (Angelova et al., 2023). След генетична консултация в началото на 2020 год., пациентът взе решение за провеждане на генетично изследване. Проведеният таргетен скрининг на *PRKAG2* гена при пациента беше отрицателен. Няколко месеца по-късно, след повторна генетична консултация, беше взето решение за провеждане на WES. Разширеният молекулярно-генетичен анализ с WES и панел от 242 гени, свързани с кардиомиопатия, доведе до идентифицирането на следните 4 генетични находки при пациента: c.181G>C, p.Ala61Pro и c.1199C>T p.Thr400Met в *GTPBP3* гена, както и c.752C>T, p.Thr251Ile и c.1760C>T, p.Pro587Leu в *POLG* гена (**фигура 4**). Вариантите p.Ala61Pro и p.Thr400Met в *GTPBP3* гена не са докладвани преди това в ClinVar или литературните бази данни. Патогенни хомозиготни варианти в *GTPBP3* гена са докладвана причина за комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране тип 23 (combined oxidative phosphorylation deficiency type 23; COXPD23) [OMIM: 616198]. Вариант p.Ala61Pro в *GTPBP3* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD v2.1.1., докато алелната честотата на варианта p.Thr400Met е оценена на 0,000004158 (без докладвани хомозиготни носители). Биоинформатичният анализ на варианта p.Ala61Pro в *GTPBP3* гена, проведен с *in silico* предикторите PolyPhen2, SIFT и Mutation Taster, го определя като увреждащ, тъй като позицията е висококонсервативна и е локализирана в N-терминалния домен на *GTPBP3*.

Липсата на варианта в контролните популации на проекта gnomAD и получените резултати от *in silico* анализа са в подкрепа на патогенната природа на варианта. Също така, PolyPhen2, SIFT и Mutation Taster определиха втория вариант p.Thr400Met в *GTPBP3* гена, като увреждащ. Аминокиселинната промяна е локализирана в G домена на *GTPBP3*, като между треонин и метионин има умерена физикохимична разлика. Ниската честота на варианта и липсата на хомозиготни носители в контролните популации на проекта gnomAD, както и получените резултати от проведения биоинформатичен анализа са в подкрепа на патогенната природа на варианта.



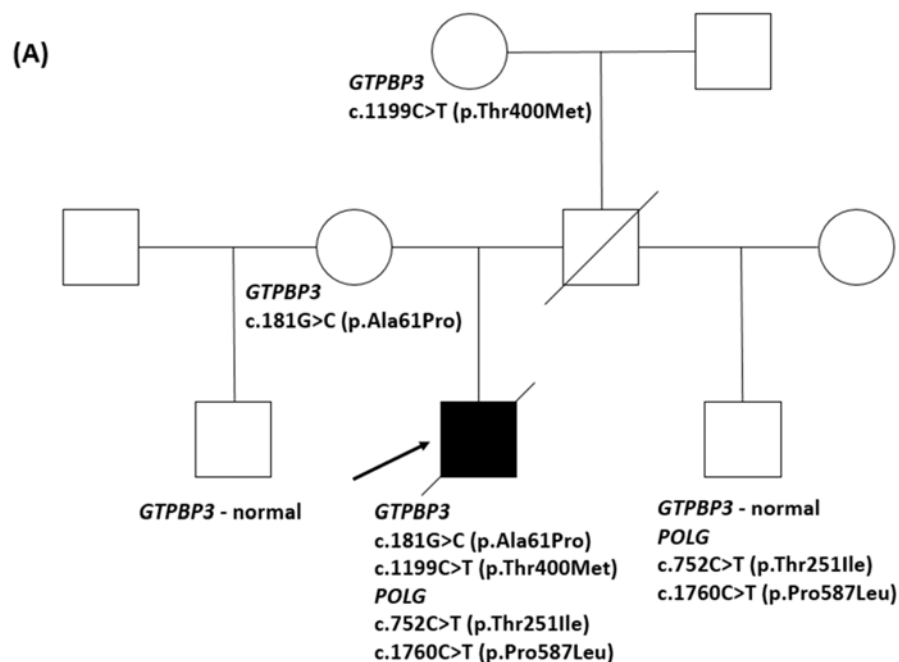
Фигура 4. Генетични находки, установени при пробанда. Молекулярно-генетичният анализ с приложението на пълно екзомно секвениране и панел от 242 гени, свързани с кардиомиопатия, откри 4 варианта при пробанда: c.181G>C (p.Ala61Pro) и c.1199C>T (p.Thr400Met) в *GTPBP3* гена (**панел А**), както и c.752C>T (p.Thr251Ile) и c.1760C>T (p.Pro587Leu) в *POLG* гена (**панел В**).

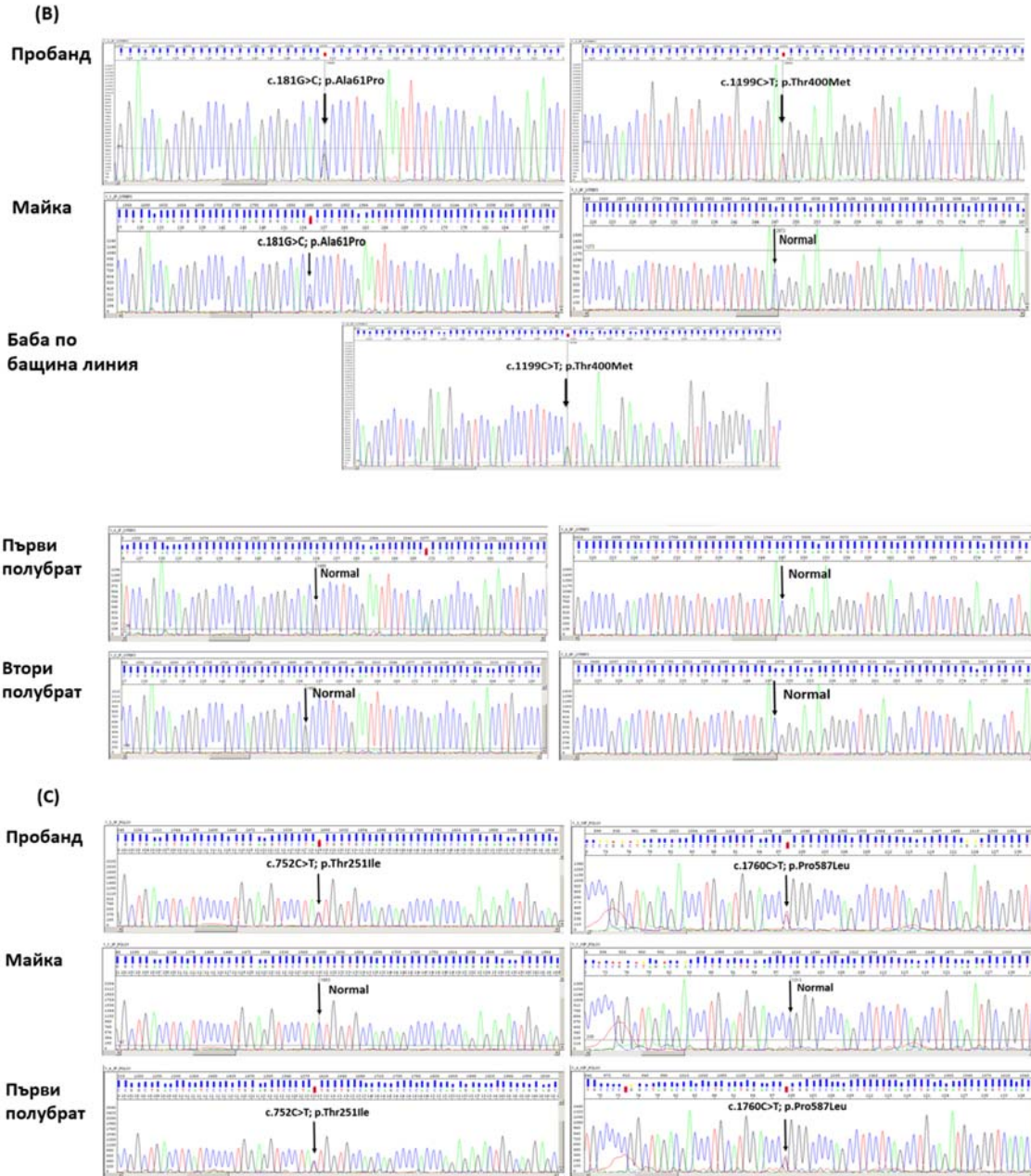
Допълнително, варианти p.Thr251Ile и p.Pro587Leu в *POLG* гена също бяха идентифицирани при проведения молекулярно-генетичен анализ при пациента. Патогенни хомозиготни варианти в *POLG* гена са съобщени при пациенти с тежки вродени синдроми на изчерпване на митохондриалната ДНК, митохондриален рецесивен атаксичен синдром и автозомно-рецесивна прогресивна външна офталмоплегия, докато патогенни хетерозиготни варианти могат да причиняват автозомно-доминантна прогресивна външна офталмоплегия. Вариантът p.Thr251Ile в *POLG* гена има алелна честота 0,001535 (един докладван хомозиготен носител), а вариантът p.Pro587Leu в *POLG* гена има алелна честота 0,001540 (един докладван хомозиготен носител) в контролните популации по проекта gnomAD v2.1.1. Вариантът p.Thr251Ile в *POLG* гена има противоречиви данни за патогенност, според резултатите от проведен *in silico* анализ (PolyPhen2 и SIFT – непатогенен, Mutation Taster – причиняващ заболяване), като позиция 752 в *POLG* е нискоконсервативна и треонин и изолевцин имат умерена физикохимична разлика. Вариантът p.Pro587Leu в *POLG* гена се определя като

увреждащ от PolyPhen2, SIFT и Mutation Taster, като промяната е на високонсервативна позиция, а между пролин и левцин има умерени физикохимична разлика.

За да се определи начина на унаследяване на заболяването и да се изясни патогенната роля на всеки един вариант, в семейството беше проведен сегрегационен анализ чрез директно секвениране по Sanger (**фигура 5, панел А**). И двата хетерозиготни варианта в *GTPBP3* гена, открити при пробанда, бяха потвърдени при секвенирането по Sanger (**фигура 5, панел В**). Резултатите от сегрегационния анализ в семейството показват, че майката на пациента е хетерозиготен носител на варианта p.Ala61Pro (майчин произход), а бабата по бащина линия на пациента е хетерозиготен носител на варианта p.Thr400Met (бащин произход) в *GTPBP3* гена. Резултатите са в съответствие с автозомно-рецесивен тип на унаследяване. Двамата здрави полубратя на пробанда не са носители на нито един от вариантите в *GTPBP3* гена. Рискът от предаване на един от вариантите в *GTPBP3* гена в потомството на пациента е 100%. Трябва да се отбележи, че резултатите от сегрегационния анализ показват, че вариантите p.Thr251Ile и p.Pro587Leu в *POLG* гена са унаследени по бащина линия при един от двамата здрави полубратя, което показва, че и двата варианта в гена *POLG* са *in cis* (на един алел) (**фигура 5, панел С**). Тази находка предполага, че тези варианти не са свързани със заболяването при пациента. Освен това, вариантите p.Thr251Ile и p.Pro587Leu в *POLG* гена са установени при 434 и 433 здрави контроли по проекта gnomAD, съответно, както и при хомозиготни носители. Тези доказателства, разгледани заедно с клиничните прояви при пациента, предполагат, че вариантите p.Thr251Ile и p.Pro587Leu в *POLG* гена не са причина за заболяването.

Според критериите на ACMG/AMP, и двата варианта в *GTPBP3* гена могат да се класифицират като VUS. Двата варианта в *POLG* гена имат противоречиви данни за патогенност, според доказателствата в базата данни ClinVar и могат да се класифицират като патогенни спрямо критериите на ACMG/AMP.

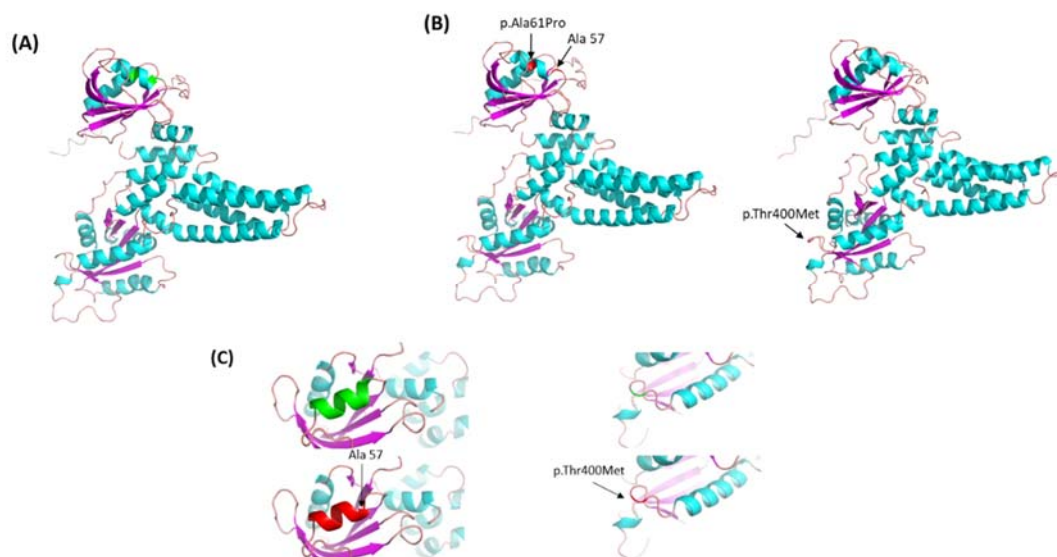




Фигура 5. Сегрегационен анализ в семейството чрез секвениране по Sanger. На панел А са представени резултатите от проведения сегрегационен анализ и идентифицираните варианти в семейството. Резултатите от сегрегационния анализ на вариантите в *GTPBP3* гена (панел В) показват, че вариант c.181G>C (p.Ala61Pro) е унаследен от бащата (идентифициран чрез секвенционните резултати на бабата по бащина линия), докато вариант c.1199C>T (p.Thr400Met) е унаследен от майката на пробанда. Нито един от полубратята на пробанда не е носител на който и да е вариант в *GTPBP3* гена. Резултатите от сегрегационния анализ на вариантите в *POLG* гена (панел С) показват, че вариантите c.752C>T (p.Thr251Ile) и c.1760C>T (p.Pro587Leu), установени при пробанда, се откриват при един от здравите полубратя на пробанда, което предполага, че те не са причина за заболяването.

С програмата AlphaFold2, създадохме *in silico* протеинови модели, показващи импакта на двата варианта, открити при нашия пациент, върху протеиновата структура на GTPBP3 (фигура 6). Данните показват, че вариантът p.Ala61Pro води до изключване на една аминокиселина (аланин 57) от съществуваща алфа-спирална структура, докато вариантът p.Thr400Met води до аминокиселинно заместване на позиция 400. Влиянието

на тези промени трябва да бъде проучено допълнително чрез *in vivo* изследвания за потвърждаване на техния ефект върху функцията на протеина.

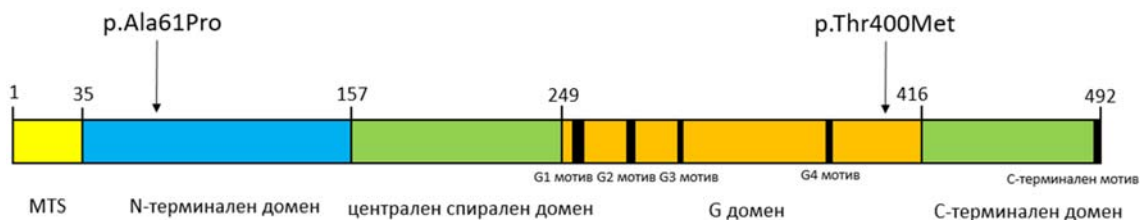


Фигура 6. *In silico* модели на GTPBP3 протеина (NM_032620.4) и структурни промени, индуцирани от генетични варианти c.181G>C (p.Ala61Pro) и c.1199C>T (p.Thr400Met) открити при нашия пробанд. На панел А е представен дивия тип GTPBP3. На панел В в червено са представени промените в протеина, в резултат на варианти c.181G>C (p.Ala61Pro) (вляво) и c.1199C>T (p.Thr400Met) (вдясно) открити при пробанда. Вариант p.Ala61Pro води до изключването на Ala 57 от алфа-спиралната структура от Ala 57 до Leu 65 (в дивия тип протеин), докато вариант p.Thr400Met води до аминокиселинна замяна на позиция 400. На панел С е представено отблизо изключването на аминокиселина Ala 57 от съществуваща алфа-спирална структура в резултат на missense вариант p.Ala61Pro вляво и аминокиселинната замяна при вариант p.Thr400Met вдясно.

4.3.2. Обсъждане

GTPBP3 е ядрен ген, кодиращ митохондриалния гуанозин трифосфат (ГТФ)-свързващ протеин 3 (GTP-binding protein 3; GTPBP3). Човешкият GTPBP3 е мултидоменен протеин, който се експресира във всички тъкани и органи и има значително повишена експресия в тъканите с висока метаболитна активност. GTPBP3 се състои от три домена - N-терминален домен, участващ в димеризацията на протеина, ГТФазен домен (G домен с G1 до G4 мотиви) и спирален домен (фигура 7) (Peng et al., 2021; Villarroya et al., 2008). Мутациите в *GTPBP3* гена се свързват с тежко митохондриално заболяване с начало в ранна кърмаческа възраст с клинични прояви на ХКМП, лактатна ацидоза и енцефалопатия (Корајтич et al., 2014). Частичното инактивиране на GTPBP3 чрез siРНК води до нарушено окислително фосфорилиране (ОХРНOS), свързано с намаляване на консумацията на кислород и на мембранный потенциал, както и производство на АТФ (Li and Guan, 2002). При проучване на *GTPBP3*-knockout клетки е установено около 20% намаление на синтеза и леко увеличение на разграждането на митохондриален протеин, както и повишени нива на супероксидни радикали (Корајтич et al., 2014). Изчерпването на GTPBP3 се свързва с митохондриална дисфункция и дефицит на дихателната верига, доказано от намалена скорост на консумация на кислород, дефекти в сглобяването на комплекс I и силно намаляване на

неговата активност (Asano et al., 2018). При проучване на *GTPBP3*-knockout модели на zebrafish е установено повлияване на митохондриалния tРНК метаболизъм и развитието на сърдечно засягане при моделните организми, характерно за клиничния фенотип при пациенти с ХКМП, носители на мутации в *GTPBP3* гена (Chen et al., 2019). С помощта на модел за стабилно заглушаване на *GTPBP3* гена е установено, че АМПК (аденозин монофосфат (АМФ)-активирана протеин киназа; AMP-activated Protein Kinase)-зависимия сигнален път има основна роля в регулацията и потискането на експресията на MPC (mitochondrial pyruvate carrier), като същевременно повишава експресията на uncoupling protein 2, което води до нарушаване на взаимовръзката между процесите на гликолизата и ОХРНОС (Martínez-Zamora et al., 2015). Тази промяна в метаболизма, съпътствана от повишена експресия на гени, участващи в гликолизата и окислението на мастните киселини, както и ниските нива на АТФ, могат да причинят сърдечно увреждане чрез увеличаване на производството на протони и лактат в сърцето. Нашият пациент е 25-годишен мъж от кавказки произход с ХКМП и бърза прогресия до 'burnt out' фаза, усложнена от тежка систолна дисфункция и камерна тахикардия, който е носител на нови хетерозиготни варианти с.181G>C, p.Ala61Pro и с.1199C>T, p.Thr400Met в *GTPBP3* гена, открити чрез WES. Вариантът p.Ala61Pro води до замяна на Ala с Pro в N-терминалния протеинов домен, докато вариантът p.Thr400Met води до замяна на Thr с Met в G домена на протеина. Двойни хетерозиготни или хомозиготни мутации в *GTPBP3* гена са докладвани за първи път от Корajtich и съавт., асоциирани с комбиниран дефицит на окислителното фосфорилиране (Корajtich et al., 2014). При всички идентифицирани 11 пациенти от 9 семейства е докладвана лактатна ацидоза, като при девет от тях е съобщена кардиомиопатия. Енцефалопатия е открита при четири от пациентите. Значителните понижения в активността на комплекси I и IV са чести и са в съответствие с наличието на дефекти в митохондриалната транслация. Шест от тези пациенти имат тежко заболяване, водещо до ранна смърт през първата година от живота. Молекулярно-генетичният анализ при тези пациенти установява, че те са хомозиготни или двойно хетерозиготни носители на мутации, засягащи митохондриалния локализиращ сигнал, N-терминалния домен, централния спирален домен и G домена на *GTPBP3*. В серия от клинични случаи на трима пациенти с COXPD23 с различна тежест на заболяването от китайски произход, *GTPBP3* двойни хетерозиготни missense и преждевременно терминаращи мутации, засягащи различни функционални домени на протеина, се свързват с лактатна ацидоза, миокардно увреждане и неврологични симптоми (Yan et al., 2021). Наскоро, двойни хетерозиготни missense мутации, които засягат централния спирален домен и C-терминалния домен на *GTPBP3*, съответно, са идентифицирани при 5-годишно момиче с COXPD23 с клинични прояви на ХКМП и хиперлактатемия (Wang et al., 2022). Детайлите по отношение на клиничните характеристики и генетичните находки при пациентите с докладвани варианти в *GTPBP3* гена, засягащи N-терминалния и G домените на протеина са обобщени в **таблица 3** (Elmas et al., 2019; Корajtich et al., 2014; Yan et al., 2021). Тези данни показват, че двойните хетерозиготни или хомозиготни варианти в *GTPBP3* гена, засягащи протеиновия N-терминален домен имат тежки последици, водещи до смърт в първата година след раждането, с изключение на пациентката от китайски произход, жива на възраст от 3 години с открити missense варианти, като вторият засяга G домена на протеина. Хомозиготни или двойни хетерозиготни варианти, засягащи G домена на *GTPBP3*, се съобщават при повечето пациенти до сега, което е в съответствие с функционалното значение на домена. Тези варианти са асоциирани с клиничен фенотип с различна тежест, който не изглежда да е силно свързан с типа вариант или въздействието върху консервативните ГТФ-свързващи мотиви.



Фигура 7. Структурно представяне на GTPBP3 протеина и неговите функционални домени. MTS представлява митохондриалната локализираща последователност. N-терминалният домен на протеина участва в димеризацията на GTPBP3. G доменът участва в свързването на гуаниновите нуклеотиди и Mg^{2+} , хидролизата на ГТФ или регулацията на функционалното състояние чрез конформационни промени. Четирите консенсусни G1, G2, G3 и G4 мотиви, участващи в свързването и хидролизата на ГТФ са обозначени с черен цвят. Спиралният домен на GTPBP3 включва централния спирален домен от ~100 аминокиселинни остатъка и C-терминалният домен. C-терминалният консенсусен мотив е представен с черен цвят. Митохондриалната локализираща последователност (MTS) е представена в жълто, N-терминалният домен – в синьо, спиралният домен с централния спирален домен и C-терминалният домен – в зелено и G домена – в оранжево. Вариантите с.181G>C (p.Ala61Pro) и с.1199C>T (p.Thr400Met) открити при нашия пробанд са отбелязани с черни стрелки.

Използвани съкращения: MTS, митохондриална локализираща последователност.

Трябва да се отбележи, че клиничните признаци на комбинирания дефицит на OXPHOS се проявяват рано след раждане или в детството при всички индивиди, докладвани до момента. В нашия случай, пациентът беше диагностициран с необструктивна ХКМП, първата клинична проява на заболяването, установена на 21-годишна възраст, което предполага много по-лек фенотип от описания по-рано. Непродължителна камерна тахикардия и синкоп не са докладвани при носители на мутации в *GTPBP3* гена в литературата. Интересно е, че пациентът няма анамнеза за неврологично засягане. Измервания на серумните нива на лактат не са извършени при пациента преди леталния изход.

При нашия пациент на 25-годишна възраст с ХКМП и бърза прогресия до 'burnt out' фаза, усложнена от тежка систолна дисфункция и камерна тахикардия, WES с приложението на молекулярно-генетичен анализ идентифицира 2 нови хетерозиготни варианти в *GTPBP3* гена, който се свързва с COXPD23. Резултатите от проведените сегрегационен анализ в семейството чрез директно секвениране по Sanger потвърди автозомно-рецесивния модел на унаследяване на заболяването. Генетичните находки и резултатите от проведените сегрегационен и биоинформатични анализи корелират с клиничните прояви при пациента, което е в подкрепа на патогенната природа на вариантите. За първи път докладвахме за заболяване с начало в зряла възраст с клинични прояви на ХКМП, синкоп, непродължителна камерна тахикардия и застойна СН, свързано с редки варианти в *GTPBP3* гена. Генетичната диагноза, генетичното консултиране и оценката на риска от унаследяване в семейството са от ключово значение при лечението на пациенти с митохондриална болест. Определянето на генотип-фенотипни корелации при пациенти с митохондриално заболяване представлява сериозно предизвикателство, като са необходими допълнителни данни от бъдещи изследвания в тази насока.

Таблица 3. Клинични характеристики и генетични находки при пациенти с докладвани варианти в *GTPBP3* гена, засягащи N-терминален и G домените на протеина.

Идентификация на пациента, докладвана от автора	Пол	Етническа принадлежност	Близкородствени отношения	Възраст на начало на заболяването	Клинични прояви	ЯМР на мозъка	Ехокардиография	Проследяване и клинични резултати при пациентите	Генетични находки Зиготност	Влияние на варианта върху протеиновата структура на GTPBP3
Носители на <i>GTPBP3</i> варианти, засягащи протеиновия N-терминален домен										
#81471 (Korajtich et al., 2014)	Мъжки	Румънска	Не	4 седмици	Хипотермия, незадоволително хранене и наддаване на тегло, невиреене, жълтеница, рецидивираща апнея и лактатна ацидоза	Абнормна дифузия на субталачичното ядро	Концентрична ЛКХ	Загива на 5-седмична възраст, метаболитна ацидоза	c.424G>A, p.Glu142Lys Хомозигот	Засяга N-терминален домен
#83904 (Korajtich et al., 2014)	Женски	Турска	Да	1 седмица	WPW, кардиогенен шок и лактатна ацидоза	NR	ДКМП	Загива на 9-месечна възраст, ЗСН с аритмия	c.32_33delinsGTG, p.Gln11Argfs*98 Хомозигот	Засяга GTPBP3 локализираща последователност, N-терминален, централен спирален, G и C-терминален домени
#83905 (Korajtich et al., 2014)	Женски	Турска	Да	При раждане	WPW, кардиогенен шок и лактатна ацидоза	NR	ДКМП	Загива на 6-месечна възраст, ЗСН	c.32_33delinsGTG, p.Gln11Argfs*98 Хомозигот	Засяга GTPBP3 локализираща последователност, N-терминален, централен спирален, G и C-терминален домени

#1 (Yan et al., 2021)	Мъжки	Китай-ска	NR	17 часа след раждане	Хипотермия, недобър отговор към проведеното лечение, тежка цианоза, дихателна недостатъчност, кардиогенен шок и лактатна ацидоза	NR	Нормална	Загиба на 4 дни, ЗСН	c.413C>T, p.Ala138Val; c.509_510del, p.Gln170Glyfs*42 Двоен хетерозигот	Засяга N-терминален домен; засяга GTPBP3 централен спирален, G и C-терминален домени
#3 (Yan et al., 2021)	Женски	Китай-ска	Не	1 година 9 месеца	Забавяне в развитието, интелектуална недостатъчност, уморяемост и лактатна ацидоза	Двустранни лезии на мозъчния ствол, таламуса и малкия мозък	ХКМП	Жива на възраст 3 години и 9 месеца	c.424G>A, p.Glu142Lys; c.785A>C, p.Gln262Pro Двоен хетерозигот	Засяга N-терминален домен; засяга G домен
Носители на GTPBP3 варианти, засягащи протеиновия G домен										
#75191 (Kopajtich et al., 2014)	Женски	NR	Не	При раждане	Незадоволително хранене, затруднен контакт, наличие на Кусмаулово дишане, тежка хипотония, дихателна недостатъчност, брадикардия и лактатна ацидоза	NR	Апикална ДКХ	Загиба на 1 ден, асистолия	c.1009G>C, p.Asp337His Хомозигот	Засяга G домен

#75168 (Kopajtich et al., 2014)	Женски	Индийска	Да	2 години	Забавяне в развитието, епилептични припадъци, интелектуална недостатъчност и лактатна ацидоза	Двустранен хиперинтензитет, засягащ целия таламус	NR	Жива на 5-годишна възраст	c.770C>A, p.Pro257His Хомозигот	Засяга G домен (ГТФ-свързващ мотив)
#72425 (Kopajtich et al., 2014)	Женски	NR	Не	3 месеца	Незадоволително хранене, невиреене, цианоза, хипореактивност и лактатна ацидоза	Двустранен хиперинтензитет на таламуса	ДКМП	Загива на 8-месечна възраст, ЗСН	c.484G>C, p.Ala162Pro; c.673G>A, p.Glu225Lys; c.964G>C, p.Ala322Pro Двоен хетерозигот (3 варианти)	Засяга централен спирален домен; засяга централен спирален домен; засяга G домен
#66143 (Kopajtich et al., 2014)	Мъжки	Арабомюсюлманска	Не	2 години	Внезапна дихателна недостатъчност, ЗСН и лактатна ацидоза	NR	ХКМП	Жив на 5-годишна възраст	c.476A>T, p.Glu159Val; c.964G>C, p.Ala322Pro Двоен хетерозигот	Засяга централен спирален домен; засяга G домен
#76671 (Kopajtich et al., 2014)	Мъжки	NR	Не	При раждане	Незадоволително хранене, хипотония, невиреене, WPW и лактатна ацидоза	Двустранен хиперинтензитет на таламуса	ХКМП	Загива на 10-месечна възраст, ЗСН	c.665-2delA, 665-2delA; p.Ala222Gly, Asp223_Ser270del Хомозигот	Прескачане на екзон 6, който съдържа консервативен ГТФ-свързващ мотив на G домена
#82790 (Kopajtich et al., 2014)	Женски	Японска	Не	1 година	Епилептични припадъци, изоставане в развитието, тежка хипотония и	Двустранен хиперинтензитет на таламуса	Нормална	Жива на 2-годишна възраст	c.8G>T, p.Arg3Leu; c.934_957del, p.Gly312_Val319del Двоен хетерозигот	Засяга GTPBP3 локализираща последователност; загуба на 8 консервативни аминокиселини

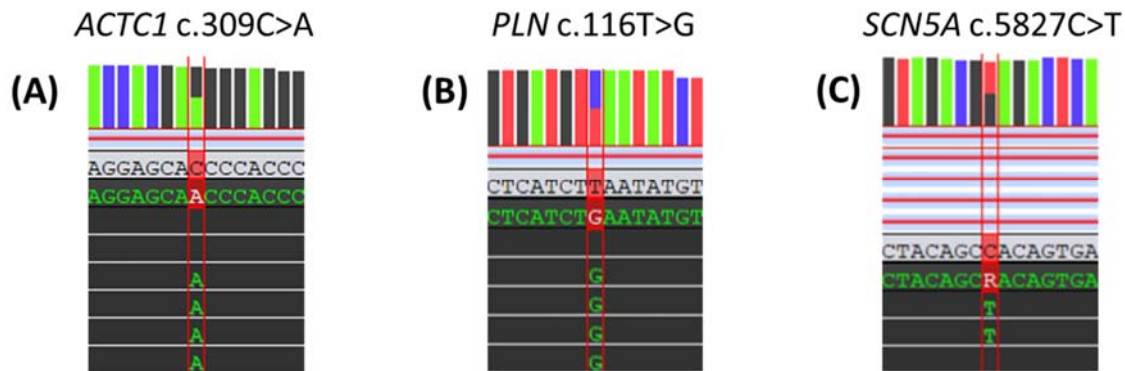
					лактатна ацидоза					остатъка в G домена
#2 (Yan et al., 2021)	Женски	Китайска	Не	1 година	Забавяне в развитието, хипотония и лактатна ацидоза	Двустранни лезии на мозъчния ствол, таламуса и малкия мозък	NR	Жива на 2-годишна възраст	c.544G>T, p.Gly182X; c.785A>C, p.Gln262Pro Двоен хетерозигот	Засяга GTPBP3 централен спирален, G и C-терминален домени; засяга G домен (ГТФ-свързващ мотив)
#24 (Elmas et al., 2019)	Женски	Турска	Да	3 месеца	Забавяне в невропсихическото развитие, гърчове, спастичност на долните крайници, тежка интелектуална недостатъчност и тромбоцитопения	Забавена миелинизация	Нормална	Жива на 10-годишна възраст	c.932C>T, p.Pro311Leu Хомозигот	Засяга G домен
Нашият пациентски случай	Мъжки	Българска	Не	21 години	Непродължителна камерна тахикардия, синкоп, ЗСН	NR	ХКМП	Загива на 27-годишна възраст, полиорганна недостатъчност	c.181G>C, p.Ala61Pro; c.1199C>T, p.Thr400Met Двоен хетерозигот	Засяга N-терминален домен; засяга G домен

Използвани съкращения: ГТФ, гуанозин трифосфат; ДКМП, дилатативна кардиомиопатия; ЗСН, застойна сърдечна недостатъчност; ЛКХ/ДКХ, левокамерна/деснокамерна хипертрофия; NR, не е докладвано; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия; WPW, Wolff-Parkinson-White синдром; ЯМР, ядрено-магнитен резонанс.

4.4. Клиничен случай на пациент с ХКМП и преживян инсулт на 41-годишна възраст

4.4.1. Резултати

Пациент №2 е 45-годишен мъж с преживян инсулт на 41-годишна възраст с хипертрофия на сърцето, известна от двадесетте му години (Gencheva et al., 2024). Майката на пациента е с перманентно ПМ от средата на тридесетте ѝ години. След генетична консултация с пациента, беше взето решение за провеждането на генетично изследване. Молекулярно-генетичният анализ с WES и приложението на панел от 242 гена, свързани с кардиомиопатия, откри следните 3 варианта: с.309C>A (p.His103Gln) в *ACTC1* гена, с.116T>G, p.Leu39Ter в *PLN* гена, както и с.5827C>T, p.His1943Tyr в *SCN5A* гена (**фигура 8**). Патогенни хетерозиготни варианти в *ACTC1* гена и в *PLN* гена са докладвана причина за ХКМП тип 11 [OMIM: 612098] и тип 18 [OMIM: 613874], съответно. Вариантите p.His103Gln в *ACTC1* гена и p.Leu39Ter в *PLN* гена са описани в ClinVar и литературните бази данни. Вариантът p.His103Gln в *ACTC1* гена не е откриван в контролните популации по проекта gnomAD v2.1.1, докато вариантът p.Leu39Ter в *PLN* гена има алелна честота 0,00001592, без докладвани хомозиготни носители. *In silico* анализ с PolyPhen2, SIFT и Mutation Taster определи варианта p.His103Gln в *ACTC1* гена като увреждащ, тъй като позиция 103 от аминокиселинната последователност на протеина е висококонсервативна, а хистидин и глутамин имат малка физикохимична разлика. Mutation Taster определи вариант p.Leu39Ter в *PLN* гена като увреждащ в съответствие с очакваната загуба на функция на протеина поради възникването на преждевременен stop кодон на позиция 39. Според критериите на ACMG/AMP, варианти p.His103Gln в *ACTC1* гена и p.Leu39Ter в *PLN* гена могат да бъдат класифицирани, съответно, като вероятно патогенен и патогенен.



Фигура 8. Генетични находки, установени при пациент №2. Молекулярно-генетичен анализ чрез цялостно екзомно секвениране и приложението на тергетен панел от 242 гена, свързани с кардиомиопатия, установи наличието на 3 варианта при пробанда: с.309C>A, p.His103Gln в *ACTC1* гена (**панел А**), с.116T>G, p.Leu39Ter в *PLN* гена (**панел В**), както и с.5827C>T, p.His1943Tyr в *SCN5A* гена (**панел С**). Генетичните варианти на *ACTC1*, *PLN* и *SCN5A* са докладвани с RefSeq NM_005159.5, NM_002667.5 и NM_001160161.2, съответно. Съгласно критериите на ACMG/AMP, вариантът с.309C>A в *ACTC1* гена може да бъде класифициран като вероятно патогенен (категории: PP3, PM5, PM2, PP2), вариантът с.116T>G в гена *PLN* може да бъде класифициран като патогенен (категории: PVS1, PP5, PM2), а вариантът с.5827C>T в *SCN5A* гена може да бъде класифициран като VUS (категория: PM2).

Използвани съкращения: ACMG/AMP, Американски колеж по медицинска генетика и геномика/Асоциация за молекулярна патология; VUS, вариант с неясно значение.

Патогенни хетерозиготни и хомозиготни варианти в *SCN5A* гена могат да причиняват *SCN5A*-свързани заболявания, включително фамилно ПМ тип 10 [OMIM: 614022]. Вариантът p.His1943Tyr в *SCN5A* гена не е докладван в ClinVar и литературните източници, както и в контролните популации по проекта gnomAD v2.1.1. Данните от *in silico* анализа показват противоречиви резултати по отношение на патогенността, като между хистидин и тирозин има умерена физикохимична разлика (PolyPhen2 – непатогенен, SIFT – увреждащ, Mutation Taster – полиморфизъм). Следователно, вариантът p.His1943Tyr в *SCN5A* гена може да бъде класифициран като VUS, според критериите на ACMG/AMP.

4.4.2. Обсъждане

Генът *ACTC1* кодира сърдечния α -актин, основния компонент на тънките миофиламенти на саркомера. Взаимодействайки с миозина и α -актинина на Z-дискете или интеркалиращите дискове, актинът има съществена роля в генерирането и предаването на сила, а генетичните мутации в *ACTC1* гена могат се свързват както с ХКМП, така и с ДКМП (Arad et al., 2005; Olson et al., 1998, 2000). Сърдечният актин е протеин, съставен от 2 домена, всеки от които се състои от 2 субдомена (Kabsch et al., 1990). В литературата се приема, че *ACTC1* вариантите в протеиновия субдомен 1, които имат пряко въздействие върху местата на свързване на миозина, могат да бъдат класифицирани като М-тип мутации, включително варианта p.His103Gln, открит при нашия пациент (Despond and Dawson, 2018). Трябва да се отбележи, че мутации от М-класа са открити само при пациенти с ХКМП досега. Данните показват, че вариантът p.Glu99Lys в *ACTC1* гена отслабва взаимодействието на актомиозина, като по този начин намалява свойствата на актина за генериране на сила и движение, в моделна експресионна система (Bookwalter and Trybus, 2006). Резултатите от проведени проучвания показват, че миозинът движи тънките миофиламенти с p.Glu99Lys варианта със значително по-бавна скорост в сравнение с миофиламентите от див тип, с увеличаване на консумацията на аденозин трифосфат (АТФ) и намалена ефикасност, което може да бъде свързано с развитието на ХКМП (Dahari and Dawson, 2015; Debold et al., 2010; Song et al., 2013). Въпреки това, данните по отношение на изчислените коефициенти на работа на миозина при изследвания с човешки протеини с М-клас *ACTC1* варианти на миозиновата АТФазна активност и на *in vitro* подвижността, са разнопосочни (само вариантът p.Glu99Lys показва увеличение на коефициента на работа), което предполага участието на други механизми в патогенезата на заболяването (Liu et al., 2018). Допълнителни изследвания на p.Glu99Lys и други М-клас варианти на сърдечния актин показват повишена чувствителност на тънките миофиламенти към калциеви йони, което е в подкрепа на хипотезата, че ХКМП може да се причинява в резултат на повишената калциева чувствителност по време на миокардната контракция (Song et al., 2011; Teng et al., 2019).

Вариантът p.His103Gln в *ACTC1* гена е докладван самостоятелно в хетерозиготно състояние при един пациент с ХКМП, включен в голямо кохортно проучване, както и в комбинация с варианта p.Lys994Arg в *MYH7* гена при 33-годишна жена с MLVWT 21 mm и симптоматична СН клас I по NYHA (Murphy et al., 2016; Wang et al., 2014). Тези доказателства предполагат, че вариантът p.His103Gln в *ACTC1* гена е рядък и са необходими повече данни и дългосрочни наблюдения, за да се характеризира по-добре асоциирания фенотип.

Генът *PLN* кодира phospholamban – малък протеин, съставен от 52 аминокиселини, съществуващ както в пентамерна, така и в мономерна форма, който се експресира предимно в сърдечна, гладка и бавносъкращаваща се скелетна мускулна тъкан (Fujii et al., 1991; Koss and Kranias, 1996; MacLennan and Kranias, 2003). Phospholamban е ключов регулатор на Ca^{2+} -АТФаза на сърдечния саркоплазмен ретикулум (SERCA2a), основен ензим в сърдечния Ca^{2+} метаболизъм, участващ в транспорта на повече от 70% от цитозолния Ca^{2+} в саркоплазмения ретикулум (MacLennan and Kranias, 2003). Активността на SERCA2a има критична роля за скоростта на транспортиране на Ca^{2+} и количеството съхранявани йони, които да бъдат освободени по време на следващия сърдечен удар, като по този начин функцията на SERCA2a има пряк ефект върху релаксацията на сърцето и може да повлияе на контрактилитета. Според съвременното разбиране, phospholamban се състои от два домена – хидрофилен домен (аминокиселини 1 до 30), включващ сайтове за фосфорилиране Ser¹⁶ и Thr¹⁷, които са от съществено значение за освобождаване на инхибиторния ефект на phospholamban върху SERCA2a в отговор на β -адренергична стимулация, и хидрофобен домен (аминокиселини 31 до 52), закотвящ протеина към мембраната на саркоплазмения ретикулум (Koss and Kranias, 1996). Данните показват, че мономерният PLN директно взаимодейства със SERCA2a, докато пентамерът представлява резервоар на мономерен PLN (MacLennan and Kranias, 2003). Хомозиготните преждевременно терминаращи мутации в *PLN* гена могат да се свързват с летална ДКМП (Haghighi et al., 2003). Данните от изследване на експлантирано сърце показват, че в хомозиготно състояние вариантът p.Leu39Ter в *PLN* гена води до намаляване с над 50% на *PLN* и РНК и липса на откриваем *PLN* протеин. При експресионните модели на мутацията е установена липса на стабилна експресия на phospholamban, неправилна локализация в цитозола или на плазмената мембрана, както и липсата на инхибиране на SERCA2a. Освен това, данните показват, че мутацията p.Leu39Ter не позволява закрепването на *PLN* към мембраната, което значително намалява олигомеризацията и свързването към SERCA2a (Kelly et al., 2008).

Мутацията p.Leu39Ter в *PLN* гена е описана за първи път от Haghighi и съавт. при две семейства с наследствена СН (Haghighi et al., 2003). В това проучване брат и сестра, носители на варианта p.Leu39Ter в *PLN* гена в хомозиготно състояние, развиват ДКМП и СН, налагаща сърдечна трансплантация, съответно на 16 и 27-годишна възраст. Интересно е да се отбележи, че при някои от хетерозиготните носители на варианта и в двете семейства се открива хипертрофия, докато други развиват ДКМП. При някои хетерозиготни носители не се установяват значими находки при провеждането на ехокардиография, което показва непълна пенетрантност на заболяването. Вариантът p.Leu39Ter в *PLN* гена също е докладван в хетерозиготно състояние при двама пациенти от мъжки пол с ДКМП (Medeiros et al., 2011; Sanoudou et al., 2015). Първият пациент е диагностициран на 42 години с ФИ при постъпване в болница от 32% и загива на 43-годишна възраст поради кардиогенен шок (Medeiros et al., 2011). Вторият пациент е диагностициран с ДКМП на 40-годишна възраст (Sanoudou et al., 2015). На 56-годишна възраст при пациента са докладвани продължителни епизоди на камерна тахикардия, както и ПМ, като той загива на 60-годишна възраст вследствие на СН. Landstrom и съавт. съобщават мутацията p.Leu39Ter в *PLN* гена при 58-годишен мъж с ХКМП с положителна фамилна анамнеза, диагностициран на 51 години, със септална и апикална хипертрофия с MLVWT 24 mm, Wolff–Parkinson–White синдром, увеличен размер на лявото предсърдие, синусова брадикардия, проводно нарушение, камерна ектопия със симптоматична непродължителна камерна тахикардия и пароксизмално ПМ/трептене (Landstrom et al., 2011). Вариантът p.Leu39Ter в *PLN* гена също е докладван в хетерозиготно състояние при 61-годишна жена с фамилна ХКМП и анамнеза за

рецидивиращо ПМ, палпитации, диспнея и пресинкоп, и в големи кохортни проучвания при пациенти с ХКМП (Alfares et al., 2015; Chiu et al., 2007; Walsh et al., 2017). Същият nonsense вариант в *PLN* гена е открит в хетерозиготно състояние при 14-годишна пациентка, оцеляла след сърдечен арест, както и при 57-годишна жена без прояви на заболяване (Mellor et al., 2017; Ng et al., 2013). Тези данни предполагат, че сърдечният фенотип, свързан с мутацията p.Leu39Ter в *PLN* гена, варира значително, като най-тежкия фенотип с най-неблагоприятни резултати е наблюдаван при хомозиготни носители на мутацията, докато при хетерозиготните носители се установява фенотип с по-лека клинична изява и непълна пенетрантност. Увеличените лузитропни и инотропни ефекти, в резултат на липсата/дисфункцията на PLN, могат да обяснят развитието на ДКМП, усложнена със СН, и ХКМП при носителите на *PLN* мутация. Въпреки това, влиянието на други недобре проучени фактори върху клиничната експресия не може да бъде изключено. Трябва да се отбележи, че ПМ се съобщава при двама от хетерозиготните носители на мутация с ХКМП и при един с ДКМП, въпреки че наличието на тази асоциация трябва да бъде допълнително изяснено в бъдещи проучвания.

Генът *SCN5A* кодира α -субединицата, съставена от 2016 аминокиселини, на сърдечен натриев канал, с четири хомоложни домена, всеки състоящ се от шест трансмембранни α -спирални сегмента (Gellens et al., 1992). Отварянето на натриевите канали, предизвикано от деполяризация на мембраната, позволява навлизането на Na^+ от извънклетъчното пространство в цитозола, последвано от бързо инактивиране със затваряне на отворените пори (Motoike et al., 2004). Установено е, че С-терминалният домен на *SCN5A*, обхващащ аминокиселинни остатъци от 1773 до 2016, е част от молекулярен комплекс заедно с протеиновата III-IV бримка, който е необходим за стабилизиране на затворения канал и минимизиране на повторното отваряне на канала по време на мембранна деполяризация. Патогенните варианти, нарушаващи това взаимодействие, са свързани със забавяне на клетъчната реполяризация и разнообразен клиничен фенотип. Вариантът p.His1943Tyr в *SCN5A* гена, идентифициран при нашия пациент, който е локализиран в С-терминалния домен на *SCN5A*, не е бил докладван в ClinVar или публикуваната литературни източници, или съобщен в контролните популации на проекта gnomAD v2.1.1, затова към момента няма достатъчно доказателства за определяне на неговата патогенност.

Данни от няколко проучвания показват, че пациентите с ХКМП, носители на различни мутации в един или повече гени, имат по-ранна възраст на диагностициране на заболяването, по-голяма MLVWT, по-голям размер на ляво предсърдие, тежка прогресия на заболяването и по-висок риск от неблагоприятни събития, включително сърдечно-съдова смърт, ВСС и смърт, свързана със СН, в сравнение с пациентите, носители на единични мутации (Girolami et al., 2010; Ingles et al., 2005; Maron et al., 2012, Heart Rhythm; Wang et al., 2014). Интересно е, че при нито един от носителите на мутацията p.Leu39Ter в *PLN* гена в описаните подробно клинични случаи до момента, не е установено също носителството на мутация в саркомерен ген. Взети заедно, тези доказателства показват незаменяемата роля на разширения панелен анализ в молекулярно-генетичните изследвания при пациенти с ХКМП и оценката на риска от унаследяване в засегнатите семейства.

WES доведе до идентифицирането на 2 хетерозиготни варианта в *ACTC1* гена и в *PLN* гена, които представляват вероятната причина за ХКМП при пациента. Освен това, беше открит хетерозиготен вариант с неясно клинично значение в *SCN5A* гена, свързан с фамилно ПМ.

В заключение, настоящият дисертационен труд предоставя първите обобщени данни по отношение на молекулярно-генетичните характеристики при пациенти с кардиомиопатия в България, както и данни относно генотип-фенотипни корелации. Получените резултати от WES и провеждането на молекулярно-генетичен анализ при 80 български пациенти с кардиомиопатия показват наличието на генетични находки при 85% от тях и висока честота на новооткрити варианти. LP/P варианти се установяват при ~46% от пациентите с ХКМП без данни за фамилна анамнеза, при ~53% от пациентите с ХКМП с данни за фамилна анамнеза, при 50% от пациентите със спорадична ДКМП и при 80% от пациентите с ДКМП с положителна фамилна анамнеза, както и при пациентка с неуточнена кардиомиопатия. Генетични находки във връзка с изявената клинична симптоматика не се установяват при пациентите с РКМП в изследваната група. При възрастните пациенти с ХКМП, носители на LP/P варианти и на LP/P варианти в саркомерните гени, се установява статистически значима разлика по отношение на по-ранна възраст на откриване на заболяването (съответно 32.96 ± 4.21 години и 32.63 ± 4.29 години спрямо 55.38 ± 9.57 години), а също и ~5.5 пъти по-ниска честота на АХ III степен спрямо пациентите без идентифицирани генетични варианти. Резултати от сегрегационни анализи чрез директно секвениране по Sanger и участието на 31 роднини са докладвани в 14 от засегнатите семейства. Получените резултати от проучванията в рамките на дисертационния труд са в подкрепа на приложението на генетични изследвания и медико-генетично консултиране при пациентите и засегнатите семейства с кардиомиопатия в България.

5. ИЗВОДИ

1. От изследваните пациенти с кардиомиопатия 85% са генетично верифицирани, което показва, че генетичното консултиране и генетичните изследвания трябва да бъдат незаменим елемент в комплексния подход за съвременна грижа при пациентите с кардиомиопатия и техните семейства.
2. Честотата на новооткритите генетични находки при български пациенти, които не са докладвани в съвременните бази данни, е висока и достига ~30%.
3. Вероятно патогенни/патогенни варианти се откриват при ~44% от изследваните пациенти с ХКМП, като само ~25% от тях са фамилни (в сравнение с докладваните ~60% в литературата), което показва необходимостта от разширяване на клиничния и генетичен скрининг в засегнатите семейства.
4. При пациентите с ХКМП с открити вероятно патогенни/патогенни варианти се установява статистически значима разлика по отношение на по-ранна възраст на откриване на заболяването в сравнение с пациентите без открити генетични находки. Тези статистически данни се потвърждават и при пациентите с установени вероятно патогенни/патогенни варианти в саркомерни гени.
5. Известни генотип-фенотипни корелации могат да имат роля в персонализирания подход по отношение на оценка на риска и определяне на поведението при пациентите с кардиомиопатия. Например изясняването на засегнатия ген и типа мутация може да има важно клинично значение при пациенти с ДКМП по отношение на оценката на риска от аритмии.
6. Наличието съответно на два или три патогенни варианти в един или повече гени при пациентите с ХКМП може да се свързва с по-тежка фенотипна изява спрямо пациентите с единични генетични мутации, което е в подкрепа на приложението на разширен панелен анализ в молекулярно-генетичните изследвания при пациенти с ХКМП.
7. Генетичните варианти, установени в *HRAS*, *NDUFB11* и *TAZ* гените, се свързват с тежка клинична изява в първите дни на постнаталния период.
8. Определянето на генотип-фенотипни корелации при пациенти с митохондриално заболяване представлява сериозно предизвикателство. Генетичната диагноза, генетичното консултиране и оценката на риска от унаследяване в семейството са от ключово значение при лечението на пациенти с митохондриална болест.

6. ПРИНОСИ

6.1. Научно-теоретични приноси:

- **Настоящият дисертационен труд предоставя първите обобщени данни относно молекулярно-генетичните характеристики при пациенти с кардиомиопатия в българската популация.**
- **Новооткритите варианти, уникални за българската популация, обогатяват световните бази данни.**

6.2. Научно-приложни приноси:

- **Получените резултати от генетичните изследвания на индексните пациенти позволяват да се направи оценка на риска от унаследяване в засегантите семейства, както и да бъдат идентифицирани и проследени високорискови близки родственици за развитие на заболяването при каскаден скрининг; възможно е изключването на този риск при роднини, които не са носители на установения генетичен вариант. При двойки във фертилна възраст е възможно провеждането на репродуктивна консултация.**

7. ПУБЛИКАЦИИ, НАУЧНИ ПРОЯВИ, ПРОЕКТИ И НАГРАДА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

7.1. ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- **Ангелова П, Митев В, Тодорова А. Молекулярно-генетична диагностика на хипертрофична кардиомиопатия.** Глава от книга: Хипертрофична обструктивна кардиомиопатия – терапевтични стратегии. Медицински университет – София, Централна медицинска библиотека 2021, 85-104. ISBN: 978-619-7491-36-4.
- **Angelova P, Velchev V, Stoyanov N, Ateamin S, Todorov T, Tourtourikov I, Mitev V, Todorova A. Novel insights on *GTPBP3*-associated hypertrophic cardiomyopathy.** Am J Med Genet A. 2023 Jul;191(7):1804-1813. doi: 10.1002/ajmg.a.63205.
Импакт фактор: 2.578, Цитирания: 1
- Gencheva D, **Angelova P**, Genova K, Ateamin S, Sleptsova M, Todorov T, Nikolov F, Ruseva D, Mitev V, Todorova A. **A Cautionary Tale of Hypertrophic Cardiomyopathy-From "Benign" Left Ventricular Hypertrophy to Stroke, Atrial Fibrillation, and Molecular Genetic Diagnostics: A Case Report and Review of Literature.** Int J Mol Sci. 2024 Aug 29;25(17):9385. doi: 10.3390/ijms25179385.
Импакт фактор: 4.9
- **Ангелова П, Стоянов Н, Велчев В, Атемин С, Слепцова М, Тодоров Т, Генчева Д, Господинова М, Печилков Д, Дашева А, Чамова Т, Танева А, Търнев И, Митев В, Тодорова А. Молекулярногенетичен профил при пациенти с кардиомиопатия в България.** Bulgarian Cardiology 30(2): 83-105. DOI: 10.3897/bgcardio.30.e127156.

ОБЩ ИМПАКТ ФАКТОР: 7.478

7.2. НАУЧНИ ПРОЯВИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- **Angelova P, Velchev V, Stoyanov N, et al. Mutations in the *GTPBP3* are associated with hypertrophic cardiomyopathy with rapid progression to burn out phase complicated by severe systolic dysfunction and ventricular tachycardia.** European Society of Human Genetics conference (ESHG 2022), Vienna, Austria, June 11-14, 2022
- **Todorova A, Angelova P, Ateamin S, et al. WES and its application for diagnostic purposes in hypertrophic cardiomyopathy.** European Society of Human Genetics conference (ESHG 2022), Vienna, Austria, June 11-14, 2022

7.3. ПРОЕКТИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Договор Д-125/04.06.2021 год. по проект с вх. № 7841/17.11.2020 год. на тема: „Молекулярно-генетични основи на хипертрофичната кардиомиопатия в България“ от конкурс „Млад изследовател - 2021 г.“ на МУ-София
- Договор Д-184/14.06.2022 год. по проект с вх. № 7308/17.11.2021 год. на тема: „Генотип-фенотипни корелации при пациенти с хипертрофична кардиомиопатия в България“ от конкурс „Млад изследовател - 2022 г.“ на МУ-София
- Договор Д-325/19.12.2022 год. по проект с вх. № 4403/04.07.2022 год. на тема: „Молекулярно-генетични характеристики на кардиомиопатиите при пациенти от България“ от конкурс „Стимулиране на научни изследвания в области с постигнати високи постижения - 2022“ на МУ-София

7.4. НАГРАДА ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- Грамота за най-успешна научна разработка в област Медицина, Медико-биологична област на проекта по Договор Д-125/04.06.2021 год. на тема: „Молекулярно-генетични основи на хипертрофичната кардиомиопатия в България“ от конкурс „Млад изследовател - 2021 г.“ на МУ-София



8. ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Ader F *et al.* (2019) FLNC pathogenic variants in patients with cardiomyopathies: Prevalence and genotype-phenotype correlations. *Clin Genet.* 96(4):317-329. doi: 10.1111/cge.13594.
2. Akhtar M and Elliott P. (2018) The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2018(3):36. doi: 10.21542/gcsp.2018.36.
3. Alfares AA *et al.* (2015) Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: Expanded panels offer limited additional sensitivity. *Genet Med.* 17(11):880-8. doi: 10.1038/gim.2014.205.
4. Ангелова П и съавт. (2024) Молекулярногенетичен профил при пациенти с кардиомиопатия в България. *Bulgarian Cardiology* 30(2): 83-105. DOI: 10.3897/bgcardio.30.e127156.
5. Angelova P *et al.* (2023) Novel insights on GTPBP3-associated hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet A.* 191(7):1804-1813. doi: 10.1002/ajmg.a.63205.
6. Arad M *et al.* (2005) Gene mutations in apical hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation.* 112(18):2805-11. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.547448.
7. Asano K *et al.* (2018) Metabolic and chemical regulation of tRNA modification associated with taurine deficiency and human disease. *Nucleic Acids Res.* 46(4):1565-1583. doi: 10.1093/nar/gky068.
8. Atemin S *et al.* (2021) MYH7-related disorders in two Bulgarian families: Novel variants in the same region associated with different clinical manifestation and disease penetrance. *Neuromuscul Disord.* 31(7):633-641. doi: 10.1016/j.nmd.2021.04.004.
9. Avdjieva-Tzavella DM *et al.* (2016) BARTH SYNDROME IN MALE AND FEMALE SIBLINGS CAUSED BY A NOVEL MUTATION IN THE TAZ GENE. *Genet Couns.* 27(4):495-501. PMID: 30226969.
10. Begay RL *et al.* (2016) FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci.* 1(5):344-359. doi: 10.1016/j.jacbts.2016.05.004.
11. Begay RL *et al.* (2018) Filamin C Truncation Mutations Are Associated With Arrhythmogenic Dilated Cardiomyopathy and Changes in the Cell-Cell Adhesion Structures. *JACC Clin Electrophysiol.* 4(4):504-514. doi: 10.1016/j.jacep.2017.12.003.
12. Bonaventura J *et al.* (2024) Relationship Between Genotype Status and Clinical Outcome in Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc.* 13(10):e033565. doi: 10.1161/JAHA.123.033565.
13. Bonnefont JP *et al.* (2004) Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med.* 25(5-6):495-520. doi: 10.1016/j.mam.2004.06.004.
14. Bookwalter CS and Trybus KM. (2006) Functional consequences of a mutation in an expressed human alpha-cardiac actin at a site implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Biol Chem.* 281(24):16777-84. doi: 10.1074/jbc.M512935200.
15. Bos JM *et al.* (2014) Characterization of a phenotype-based genetic test prediction score for unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 89:727-37. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.01.025.
16. Cetinkaya A *et al.* (2020) Radixin Relocalization and Nonmuscle α -Actinin Expression Are Features of Remodeling Cardiomyocytes in Adult Patients with Dilated Cardiomyopathy. *Dis Markers.* 22:2020:9356738. doi: 10.1155/2020/9356738.
17. Chen D *et al.* (2019) Deletion of Gtpbp3 in zebrafish revealed the hypertrophic cardiomyopathy manifested by aberrant mitochondrial tRNA metabolism. *Nucleic Acids Res.* 47(10):5341-5355. doi: 10.1093/nar/gkz218.
18. Chiu C *et al.* (2007) Genetic screening of calcium regulation genes in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 43(3):337-43. doi: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.009.
19. Dahari M and Dawson JF. (2015) Do cardiac actin mutations lead to altered actomyosin interactions? *Biochem Cell Biol.* 93(4):330-4. doi: 10.1139/bcb-2014-0156.
20. De Bartoli M *et al.* (2017) Co-inheritance of mutations associated with arrhythmogenic cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet.* 25(10):1165-1169. doi: 10.1038/ejhg.2017.109.
21. Debold EP *et al.* (2010) Human actin mutations associated with hypertrophic and dilated cardiomyopathies demonstrate distinct thin filament regulatory properties in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 48(2):286-92. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.09.014.
22. Despond EA and Dawson JF. (2018) Classifying Cardiac Actin Mutations Associated With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Physiol.* 9:405. doi: 10.3389/fphys.2018.00405.
23. Elmas M *et al.* (2019) Comparison of clinical parameters with whole exome sequencing analysis results of autosomal recessive patients; a center experience. *Mol Biol Rep.* 46(1):287-299. doi: 10.1007/s11033-018-4470-7.
24. Fernlund *et al.* (2020) Hereditary Hypertrophic Cardiomyopathy in Children and Young Adults—The Value of Reevaluating and Expanding Gene Panel Analyses. *Genes (Basel).* 11(12):1472. doi: 10.3390/genes11121472.
25. Fujii J *et al.* (1991) Structure of the rabbit phospholamban gene, cloning of the human cDNA, and assignment of the gene to human chromosome 6. *J Biol Chem.* 266(18):11669-75. PMID: 1828805.
26. Garcia-Castro M *et al.* (2009) Mutations in sarcomeric genes MYH7, MYBPC3, TNNT2, TNNI3, and TPM1 in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Rev Esp Cardiol.* 62(1):48-56. PMID: 19150014.
27. Gellens ME *et al.* (1992) Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(2):554-8. doi: 10.1073/pnas.89.2.554.
28. Gencheva D *et al.* (2024) A Cautionary Tale of Hypertrophic Cardiomyopathy-From "Benign" Left Ventricular Hypertrophy to Stroke, Atrial Fibrillation, and Molecular Genetic Diagnostics: A Case Report and Review of Literature. *Int J Mol Sci.* 25(17):9385. doi: 10.3390/ijms25179385.
29. Gigli M *et al.* (2019) Genetic Risk of Arrhythmic Phenotypes in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 74(11):1480-1490. doi: 10.1016/j.jacc.2019.06.072.

30. Girolami F *et al.* (2010) Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J. Am. Coll. Cardiol.* 55, 1444–1453. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.062.
31. Gruner C *et al.* (2013) Toronto hypertrophic cardiomyopathy genotype score for prediction of a positive genotype in hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 6(1):19-26. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.112.963363.
32. Haas J *et al.* (2015) Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 36(18):1123-35a. doi: 10.1093/eurheartj/ehu301.
33. Haghighi K *et al.* (2003) Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest.* 111(6):869-76. doi: 10.1172/JCI17892.
34. Heidenreich PA *et al.* (2022) 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 79(17):e263-e421. doi: 10.1016/j.jacc.2021.12.011.
35. Helms AS *et al.* (2020) Spatial and Functional Distribution of MYBPC3 Pathogenic Variants and Clinical Outcomes in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genom Precis Med.* 13(5):396-405. doi: 10.1161/CIRCGEN.120.002929.
36. Hershberger RE *et al.* (2013) Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol.* 10(9):531-47. doi: 10.1038/nrcardio.2013.105.
37. Ho CY *et al.* (2018) Genotype and Lifetime Burden of Disease in Hypertrophic Cardiomyopathy: Insights from the Sarcomeric Human Cardiomyopathy Registry (SHaRe). *Circulation.* 138(14):1387-1398. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033200.
38. Ingles J *et al.* (2005) Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet.* 42:e59. doi: 10.1136/jmg.2005.033886.
39. Ingles J *et al.* (2013) Clinical predictors of genetic testing outcomes in hypertrophic cardiomyopathy. *Genet Med.* 15(12):972-7. doi: 10.1038/gim.2013.44.
40. Joshi PR *et al.* (2014) Carnitine palmitoyltransferase II (CPT II) deficiency: genotype-phenotype analysis of 50 patients. *J Neurol Sci.* 338(1-2):107-11. doi: 10.1016/j.jns.2013.12.026.
41. Kabsch W *et al.* (1990) Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 347(6288):37-44. doi: 10.1038/347037a0.
42. Kelly EM *et al.* (2008) Phospholamban oligomerization, quaternary structure, and sarco(endo)plasmic reticulum calcium ATPase binding measured by fluorescence resonance energy transfer in living cells. *J Biol Chem.* 283(18):12202-11. doi: 10.1074/jbc.M707590200.
43. Kopajtich R *et al.* (2014) Mutations in GTPBP3 cause a mitochondrial translation defect associated with hypertrophic cardiomyopathy, lactic acidosis, and encephalopathy. *Am J Hum Genet.* 95(6):708-20. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.10.017.
44. Koss KL and Kranias EG. (1996) Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res.* 79(6):1059-63. doi: 10.1161/01.res.79.6.1059.
45. Landstrom AP *et al.* (2011) PLN-encoded phospholamban mutation in a large cohort of hypertrophic cardiomyopathy cases: summary of the literature and implications for genetic testing. *Am Heart J.* 161(1):165-71. doi: 10.1016/j.ahj.2010.08.001.
46. Li X and Guan MX. (2002) A human mitochondrial GTP binding protein related to tRNA modification may modulate phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S rRNA mutation. *Mol Cell Biol.* 22(21):7701-11. doi: 10.1128/MCB.22.21.7701-7711.2002.
47. Liu H *et al.* (2018) Cardiac actin changes in the actomyosin interface have different effects on myosin duty ratio. *Biochem Cell Biol.* 96(1):26-31. doi: 10.1139/bcb-2017-0136.
48. Lopes LR *et al.* (2013) A systematic review and meta-analysis of genotype-phenotype associations in patients with hypertrophic cardiomyopathy caused by sarcomeric protein mutations. *Heart.* 99(24):1800-11. doi: 10.1136/heartjnl-2013-303939.
49. Lopes LR *et al.* (2015) Novel genotype-phenotype associations demonstrated by high-throughput sequencing in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Heart.* 101(4):294-301. doi: 10.1136/heartjnl-2014-306387.
50. MacLennan DH and Kranias EG. (2003) Phospholamban: A crucial regulator of cardiac contractility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(7):566-77. doi: 10.1038/nrm1151.
51. Marian AJ and Braunwald E. (2017) Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res.* 121(7): 749–770. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311059.
52. Maron BJ *et al.* (2012) Double or compound sarcomere mutations in hypertrophic cardiomyopathy: A potential link to sudden death in the absence of conventional risk factors. *Heart Rhythm.* 9(1):57-63. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.08.009.
53. Martínez-Zamora A *et al.* (2015) Defective Expression of the Mitochondrial-tRNA Modifying Enzyme GTPBP3 Triggers AMPK-Mediated Adaptive Responses Involving Complex I Assembly Factors, Uncoupling Protein 2, and the Mitochondrial Pyruvate Carrier. *PLoS One.* 10(12):e0144273. doi: 10.1371/journal.pone.0144273.
54. Medeiros A *et al.* (2011) Mutations in the human phospholamban gene in patients with heart failure. *Am Heart J.* 162(6):1088-1095.e1. doi: 10.1016/j.ahj.2011.07.028.
55. Mellor G *et al.* (2017) Genetic Testing in the Evaluation of Unexplained Cardiac Arrest: From the CASPER (Cardiac Arrest Survivors With Preserved Ejection Fraction Registry). *Circ Cardiovasc Genet.* 10(3):e001686. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001686.
56. Motoike HK *et al.* (2004) The Na⁺ channel inactivation gate is a molecular complex: A novel role of the COOH-terminal domain. *J Gen Physiol.* 123(2):155-65. doi: 10.1085/jgp.200308929.
57. Murphy SL *et al.* (2016) Evaluation of the Mayo Clinic Phenotype-Based Genotype Predictor Score in Patients with Clinically Diagnosed Hypertrophic Cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res.* 9(2):153-61. doi: 10.1007/s12265-016-9681-5.
58. Ng D *et al.* (2013) Interpreting secondary cardiac disease variants in an exome cohort. *Circ Cardiovasc Genet.* 6(4):337-46. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.113.000039.

59. Nguyen K *et al.* (2019) Whole Exome Sequencing Reveals a Large Genetic Heterogeneity and Revisits the Causes of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genom Precis Med.* 12(5):e002500. doi: 10.1161/CIRCGEN.119.002500.
60. Norton N *et al.* (2012) Evaluating Pathogenicity of Rare Variants From Dilated Cardiomyopathy in the Exome Era. *Circ Cardiovasc Genet.* 5(2):167-74. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.111.961805.
61. Olivetto I *et al.* (2008) Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 83(6):630-8. doi: 10.4065/83.6.630.
62. Olson TM *et al.* (1998) Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science.* 280(5364):750-2. doi:10.1126/science.280.5364.750.
63. Olson TM *et al.* (2000) Inherited and de novo mutations in the cardiac actin gene cause hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 32(9):1687-94. doi: 10.1006/jmcc.2000.1204.
64. Ommen SR *et al.* (2020) 2020 AHA/ACC Guideline for the Diagnosis and Treatment of Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 76(25):e159-e240. doi: 10.1016/j.jacc.2020.08.045.
65. Ouellette *et al.* (2018) Clinical genetic testing in pediatric cardiomyopathy: Is bigger better? *Clin Genet.* 93(1):33-40. doi:10.1111/cge.13024.
66. Peng GX *et al.* (2021) The human tRNA taurine modification enzyme GTPBP3 is an active GTPase linked to mitochondrial diseases. *Nucleic Acids Res.* 49(5):2816-2834. doi: 10.1093/nar/gkab104.
67. Pfeffer TJ *et al.* (2019) Increased Cancer Prevalence in Peripartum Cardiomyopathy. *JACC CardioOncol.* 1(2):196-205. doi: 10.1016/j.jacc.2019.09.008.
68. Pugh *et al.* (2014) The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical DNA sequencing. *Genet Med.* 16(8):601-8. doi:10.1038/gim.2013.204.
69. Sanoudou D *et al.* (2015) Genetic modifiers to the PLN L39X mutation in a patient with DCM and sustained ventricular tachycardia? *Glob Cardiol Sci Pract.* 2015(2):29. doi: 10.5339/gcsp.2015.29.
70. Song W *et al.* (2011) Molecular mechanism of the E99K mutation in cardiac actin (ACTC Gene) that causes apical hypertrophy in man and mouse. *J Biol Chem.* 286(31):27582-93. doi: 10.1074/jbc.M111.252320.
71. Song W *et al.* (2013) Mechanical and energetic properties of papillary muscle from ACTC E99K transgenic mouse models of hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 304(11):H1513-24. doi: 10.1152/ajpheart.00951.2012.
72. Teng GZ *et al.* (2019) M-class hypertrophic cardiomyopathy cardiac actin mutations increase calcium sensitivity of regulated thin filaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 519(1):148-152. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.151.
73. van Driest SL *et al.* (2004) Myosin binding protein C mutations and compound heterozygosity in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 44(9):1903-10. doi: 10.1016/j.jacc.2004.07.045.
74. van Driest SL *et al.* (2005) Yield of Genetic Testing in Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* 80(6):739-44. doi: 10.1016/S0025-6196(11)61527-9.
75. Villarroya M *et al.* (2008) Characterization of human GTPBP3, a GTP-binding protein involved in mitochondrial tRNA modification. *Mol Cell Biol.* 28(24):7514-31. doi: 10.1128/MCB.00946-08.
76. Waldmüller S *et al.* (2011) Novel correlations between the genotype and the phenotype of hypertrophic and dilated cardiomyopathy: results from the German Competence Network. *Heart Failure Eur J Heart Fail.* 13(11):1185-92. doi: 10.1093/eurjhf/hfr074.
77. Walsh R *et al.* (2017) Reassessment of Mendelian gene pathogenicity using 7,855 cardiomyopathy cases and 60,706 reference samples. *Genet Med.* 19(2):192-203. doi: 10.1038/gim.2016.9.
78. Wang C *et al.* (2022) Generation of patient-derived iPSC lines from a girl with Combined Oxidative Phosphorylation Deficiency 23 (COXPD23) caused by compound heterozygous GTPBP3 variants. *Stem Cell Res.* 61:102775. doi: 10.1016/j.scr.2022.102775.
79. Wang J *et al.* (2014) Malignant effects of multiple rare variants in sarcomere genes on the prognosis of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 16(9):950-7. doi: 10.1002/ejhf.144.
80. Wieser T. (2004) Carnitine Palmitoyltransferase II Deficiency. In: Adam MP *et al.* (eds). *GeneReviews*[®] [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. PMID: 20301431.
81. Wilde AAM *et al.* (2022) European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases. *Heart Rhythm.* 19(7):e1-e60. doi: 10.1016/j.hrthm.2022.03.1225.
82. Yan HM *et al.* (2021) Novel Mutations in the GTPBP3 Gene for Mitochondrial Disease and Characteristics of Related Phenotypic Spectrum: The First Three Cases From China. *Front Genet.* 12:611226. doi: 10.3389/fgene.2021.611226.