

МОЛЕКУЛЯРНОГЕНЕТИЧЕН ПРОФИЛ ПРИ ПАЦИЕНТИ С КАРДИОМИОПАТИЯ В БЪЛГАРИЯ

П. Ангелова^{1*}, Н. Стоянов², В. Велчев², С. Атемин³, М. Слептова³, Т. Тодоров³; Д. Генчева^{4,5},
М. Господинова⁶; Д. Печилков⁷, А. Дашева^{8,9}, Т. Чамова^{10,11}, А. Танева^{10,11}, И. Търнев^{10,11,12}, В. Митев¹,
А. Тодорова¹

¹Катедра „Медицинска химия и биохимия“, Медицински университет – София

²Клиника по кардиология, УМБАЛ “Св. Анна” – София

³Генетична медико-диагностична лаборатория “Геника” – София

⁴Първа катедра по вътрешни болести, Секция “Кардиология”, Медицински университет – Пловдив

⁵Клиника по кардиология, УМБАЛ “Св. Георги” – Пловдив

⁶УМБАЛ “Св. Иван Рилски” – София

⁷Клиника по детска кардиология, Национална кардиологична болница – София

⁸Катедра „Педиатрия“, Медицински университет – София

⁹Клиника по детска ревматология и кардиология, СБАЛДБ “Проф. Иван Митев” – София

¹⁰Катедра „Неврология“, Медицински университет – София

¹¹Клиника по неврология, УМБАЛ “Александровска” – София

¹²Департамент по когнитивна наука и психология, Нов български университет – София

MOLECULAR-GENETIC PROFILE IN PATIENTS WITH CARDIOMYOPATHY IN BULGARIA

P. Angelova^{1*}, N. Stoyanov², V. Velchev², S. Ateemin³, M. Sleptsova³, T. Todorov³, D. Gencheva^{4,5},
M. Gospodinova⁶, D. Pechilkov⁷, A. Dasheva^{8,9}, T. Tchamova^{10,11}, A. Taneva^{10,11}, I. Tournev^{10,11,12}, V. Mitev¹,
A. Todorova¹

¹Department of Medical chemistry and biochemistry, Medical University – Sofia

²Department of Cardiology, UMHAT “Sveta Anna” – Sofia

³Genetic Medico-Diagnostic Laboratory “Genica” – Sofia

⁴First department of internal disease, Section of Cardiology, Medical University – Plovdiv

⁵Department of Cardiology, UMHAT “Sveti Georgi” – Plovdiv

⁶UMHAT “Sveti Ivan Rilski” – Sofia

⁷Department of Pediatric cardiology, National Heart Hospital – Sofia

⁸Department of Pediatrics, Medical University – Sofia

⁹Department of Pediatric rheumatology and cardiology, Specialised Hospital
for Active Treatment of Children’s Diseases “Prof. Ivan Mitev” – Sofia

¹⁰Department of Neurology, Medical University – Sofia

¹¹Department of Neurology, UMHAT “Alexandrovska” – Sofia

¹²Department of Cognitive Science and Psychology, New Bulgarian University – Sofia

Резюме.

Въведение: Кардиомиопатиите са клинично и генетично хетерогенна група заболявания, които се свързват със значителна заболяемост и смъртност. **Целта** на настоящото проучване е изясняването на молекулярногенетичните характеристики на кардиомиопатиите при пациенти в България. **Материал и методи:** В настоящото проучване по метода на таргетен анализ на разширен панел от 242 гена, свързани с кардиомиопатия, и на допълнителен панел от 20 гена, асоциирани с наследствена амилоидоза, бяха изследвани общо 20 български пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия, както следва: 12 пациенти с хипертрофична кардиомиопатия (ХКМП), включително 1 педиатричен пациент, 6 пациенти с дилатативна кардиомиопатия (ДКМП), от които 2-ма педиатрични пациенти и 2-ма пациенти с рестриктивна кардиомиопатия (РКМП). Сегрегационните анализи в семействата бяха проведени чрез директно секвениране по Sanger. **Резултати:** Получените резултати показват наличието на генетични находки при 90% от пациентите. Патогенни/вероятно патогенни варианти се установяват при 12 от изследваните пациенти (60%), а генетични находки във връзка с изявената клинична симптоматика не се откриват при пациентите с РКМП в проучването (10%).

Приблизително 1/3 от включените пациенти имат фамилна анамнеза за внезапна сърдечна смърт или кардиомиопатия. Патогенни/вероятно патогенни варианти се откриват при 55% от пациентите с ХКМП без данни за фамилна анамнеза, при ~ 67% от пациентите с ХКМП с фамилна анамнеза или със спорадична ДКМП, а честотата достига 100% при пациентите с ДКМП с положителна фамилна анамнеза. В проучваната група се установява съответно 2,5 и 4 пъти по-висока честота на преждевременно терминаращи варианти в сравнение с докладваните около 10% в литературата, както при пациентите с ХКМП, така и при пациентите с ДКМП. Патогенни/вероятно патогенни варианти в *MYBPC3* гена (71%) се откриват с най-висока честота при пациентите с ХКМП, докато ДКМП се характеризира с разнообразен генетичен профил, а установените находки в *NDUFB11* и *TAZ* гените се свързват с тежка клинична изява при педиатрични пациенти в първите дни на постнаталния период. Резултати от проведени сегрегационни анализи са докладвани в 6 от засегнатите семейства. **Заключение:** Данните от настоящото проучване са в подкрепа на приложението на генетични изследвания и медико-генетично консултиране при пациентите и засегнатите семейства с кардиомиопатия в България.

Ключови думи: генетични изследвания, цялостно екзомно секвениране, кардиомиопатии, хипертрофична кардиомиопатия, дилатативна кардиомиопатия

Адрес за кореспонденция: *Петя Ангелова, Катедра „Медицинска химия и биохимия“, Медицински университет – София, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, e-mail: p.p.angelova@gmail.com

Abstract.

Introduction: Cardiomyopathies are a clinically and genetically heterogeneous group of diseases, that are associated with significant morbidity and mortality. The aim of the present study is to clarify the molecular-genetic characteristics of cardiomyopathies in patients in Bulgaria. **Material and methods:** In the present study, targeted analysis of an expanded panel of 242 genes, associated with cardiomyopathy, and an additional panel of 20 genes, associated with hereditary amyloidosis, was performed in a total of 20 Bulgarian patients, diagnosed with cardiomyopathy, as follows: 12 patients with hypertrophic cardiomyopathy (HCM), including 1 pediatric patient, 6 patients with dilated cardiomyopathy (DCM), of whom 2 pediatric patients, and 2 patients with restrictive cardiomyopathy (RCM). Family segregation analyses were performed by direct Sanger sequencing. **Results:** Genetic findings were present in 90% of the patients. Pathogenic/likely pathogenic variants were found in 12 of the patients (60%), while genetic findings related to the clinical symptoms were not detected in the RCM patients (10%). Approximately 1/3 of the patients had a family history of sudden cardiac death or cardiomyopathy. Pathogenic/likely pathogenic variants were found in 55% of HCM patients with no family history, in ~67% of HCM patients with family history or with sporadic DCM, and in 100% of DCM patients with a positive family history. A respectively 2,5 and 4-fold higher frequency of truncating variants was found in the study group compared to the reports of around 10% in the literature, both in patients with HCM, and in patients with DCM. Pathogenic/likely pathogenic variants in the *MYBPC3* gene (71%) were found with the highest frequency in HCM, while DCM is characterized by a diverse genetic profile, and genetic findings in the *NDUFB11* and *TAZ* genes were associated with severe clinical presentation in pediatric patients in the first postnatal days. Results of segregation analyses were reported in 6 of the affected families. **Conclusion:** The data from the present study supports the importance of conducted genetic testing and medical-genetic counseling in patients and affected families with cardiomyopathy in Bulgaria

Key words: genetic testing, whole exome sequencing, cardiomyopathies, hypertrophic cardiomyopathy, dilated cardiomyopathy

Address for correspondence: Petya Angelova, Medical University – Sofia, Department of Medical chemistry and biochemistry, 2 Zdrave str., Bg –1431 Sofia, e-mail: p.p.angelova@gmail.com

ВЪВЕДЕНИЕ

Кардиомиопатиите са разнообразна група заболявания на сърцето, свързани с механична и/или електрическа дисфункция и развитието на дилатативен, хипертрофичен, рестриктивен или аритмогенен фенотип в резултат на различни причини, които често са генетични [1]. Фенотипът на тези заболявания може да се причинява от мутации в много различни

INTRODUCTION

Cardiomyopathies are a diverse group of heart diseases, associated with mechanical and/or electrical dysfunction leading to the development of a dilated, hypertrophic, restrictive or arrhythmogenic phenotype as a result of various causes, which are often genetic [1]. The phenotype of these diseases may be caused by mutations in many different genes, with approximate-

гени, като са установени приблизително 100 гена, които могат да се свързват с кардиомиопатии [2]. Вариабилната експресия и непълната пенетрантност на кардиомиопатиите могат да се обяснят с влиянието на фактори на околната среда и други регулаторни механизми върху фенотипната изява.

Хипертрофичната кардиомиопатия (ХКМП) е най-честото наследствено сърдечно заболяване със заболяемост от 1:500 до 1:200 в общата популация [3, 4]. Разпространено е по целия свят и засяга различни етнически групи, раси и двата пола поравно, като не се установяват значими разлики в генетичните мутации и фенотипната изява на заболяването в зависимост от демографските характеристики на пациентите [5]. ХКМП се характеризира със сложна патофизиология и се причинява от патогенни варианти в поне 30 гена, кодиращи протеините на сърдечния саркомер и други протеини, а при част от пациентите специфична мутация не се установява [6, 7]. В литературата са докладвани повече от 2000 варианта, свързани с ХКМП, докато честотата на възникване на спонтанни или *de novo* мутации остава неизяснена [5, 8]. Унаследяването на ХКМП се определя като автозомно-доминантно, но в редки случаи е възможно автозомно-рецесивно, Х-свързано или митохондриално унаследяване [9]. С най-висока честота при пациентите с генетично изяснено заболяване се установяват патогенни варианти в гените *MYH7* (β -миозинова тежка верига) и *MYBPC3* (миозин-свързващ протеин С) – при приблизително 75-84% [10]. Мутации в гена за тропонин Т2 (*TNNT2*) са докладвани при 5-15% от случаите, за тропонин I (*TNNI3*) при 5%, а за α -тропомиозин (*TPM1*) – при 3% от пациентите с ХКМП. Патогенни мутации са открити също така в гените *MYL2*, *LBD3*, *MYL3*, *ACTC1* и в други гени със съответно по-ниска честота, а гено- и фенотипната изява представляват наследствени и ненаследствени заболявания, на които се дължат 5 до 10% от случаите на ХКМП.

Дилатативната кардиомиопатия (ДКМП) е често сърдечно заболяване с честота $\geq 1:250$ в общата популация, като 30-35% от случаите се дължат на генетично заболяване [11, 12]. Случаите с неизвестна етиология се класифицират като идиопатична ДКМП, която представлява диагноза на изключване [12]. Докладвано е, че при систематичен скрининг на роднини от първа степен на пациенти с новодиагностицирана идиопатична ДКМП се открива фамиленост при 20-35% от тях [13]. ДКМП се причинява от мутации в повече от 30 гена, засягащи протеини на разнообразни клетъчни структури, като саркомера, ядрената обвивка, цитоскелета, митохондриите, сарколемата и междуклетъчните контакти [11, 14]. Мутации в някои от тези гени се свързват също така с други кардиомиопатии, както и с каналопатии, мускулна дистрофия и синдромни заболявания [11]. Варианти, причиняващи

ly 100 genes identified, that could be associated with cardiomyopathies [2]. The variable expression and incomplete penetrance of cardiomyopathies may be explained by the influence of environmental factors and other regulatory mechanisms on phenotypic expression.

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is the most common inherited heart disease with a prevalence of 1:500 to 1:200 in the general population [3, 4]. It is distributed in countries around the world and affects different ethnic groups, races and both sexes equally, with no significant differences in genetic mutations and phenotypic expression of the disease depending on the demographic characteristics of patients established [5]. HCM is characterized by a complex pathophysiology and is caused by pathogenic variants in at least 30 genes, encoding proteins of the cardiac sarcomere and other proteins, and in a proportion of patients no specific mutation is identified [6, 7]. More than 2,000 variants, associated with HCM have been reported in literature, while the frequency of occurrence of spontaneous or *de novo* mutations remains unclear [5, 8]. Inheritance of HCM is defined as autosomal dominant, but in rare cases autosomal recessive, X-linked or mitochondrial inheritance is possible [9]. Pathogenic variants in the *MYH7* (β -myosin heavy chain) and *MYBPC3* (myosin binding protein C) genes are found with the highest frequency in patients with genetically clarified disease – in approximately 75-84% [10]. Mutations in the troponin T2 (*TNNT2*) gene are reported in 5-15% of cases, in the troponin I gene (*TNNI3*) in 5%, and in the α -tropomyosin gene (*TPM1*) in 3% of patients with HCM. Pathogenic mutations have also been identified in the genes *MYL2*, *LBD3*, *MYL3*, *ACTC1* and in other genes, respectively with a lower frequency, while genocopies and phenocopies represent hereditary and non-hereditary diseases that account for 5 to 10% of HCM cases.

Dilated cardiomyopathy (DCM) is a common heart disease with a prevalence of $\geq 1:250$ in the general population, with 30-35% of cases caused by genetic disease [11, 12]. Cases of unknown etiology are classified as idiopathic DCM, which is a diagnosis of exclusion [12]. It has been reported that with systematic screening of first-degree relatives of patients with newly diagnosed idiopathic DCM, family disease is found in 20-35% of them [13]. DCM is caused by mutations in more than 30 genes that affect proteins of diverse cell structures such as the sarcomere, nuclear envelope, cytoskeleton, mitochondria, sarcolemma, and intercellular contacts [11, 14]. Mutations in some of these genes are also associated with other cardiomyopathies, as well as channelopathies, muscular dystrophy, and syndromic diseases [11]. Variants causing truncations in the *TTN*

преждевременно терминиране в гена *TTN*, кодиращ най-големия протеин в сърцето – титин, са причина за ~25% от фамилените случаи и 18% от спорадичните случаи на ДКМП [15]. Патогенни варианти в *LMNA* гена са втората най-често докладвана причина за ДКМП и се съобщават при 6% от пациентите [11]. Мутациите във всеки един от останалите гени, които се свързват с ДКМП, изглежда, че причиняват < 5% от случаите на заболяването – напр. *MYH7* (~4%), *MYBPC3*, *TNNT2*, *MYPN*, *SCN5A*, *RBM20* (~2% всеки) и *PLN* (~1%) [16]. ДКМП най-често се унаследява по автозомно-доминантен модел, въпреки че е възможно автозомно-рецесивно, X-свързано или митохондриално унаследяване.

Аритмогенната кардиомиопатия (АКМП) е прогресивно, наследствено заболяване на миокарда, което е водеща причина за камерна аритмия и внезапна сърдечна смърт (ВСС) при млади лица [17]. АКМП може да засяга предимно дясната камера (АДКМП), предимно лявата камера (АЛКМП) или и двете камери на сърцето. Заболяемостта от АДКМП се оценява на 1:5000 и по-висока в кохорти с италиански и германски произход (1:2000) [18]. При приблизително 50% от пациентите с АКМП се установяват патогенни варианти в десмосомните гени, включително *PKP2*, *DSP*, *DSG2*, *DSC2* и *JUP*, а най-често са докладвани мутации в *PKP2* гена, кодиращ протеина плакофилин 2 – при 20-45% от пациентите [19]. АКМП най-често се унаследява по автозомно-доминантен модел, а автозомно-рецесивните форми са редки и се свързват основно с кардиокутанните синдроми на Naxos и Carvajal, които се причиняват от хомозиготни мутации в гените *JUP* и съответно *DSP* [17, 20]. Патогенни мутации в гените *DES*, *FLNC*, *PLN*, *SCN5A* и *TMEM43* също са докладвани при пациенти с АКМП [20].

Левокамерната некомпактна кардиомиопатия (ЛНКМП) е рядко заболяване, което се свързва с наличието на множество трабекулации в левокамерния миокард [21]. Счита се, че се дължи на арест на миокардната компактизация в късен етап от феталното развитие на сърцето, но също така може да бъде придобита – освен фамилените и спорадични форми, се установява при тренирани атлети, пациенти със сърповидноклетъчна болест и при бременни [16, 21]. Заболяемостта от ЛНКМП варира в границите 0,14 и 1,26% при пациенти, реферирани за ехокардиография, според данните от различни проучвания, и се свързва с 9,5% от случаите на кардиомиопатия при деца [21]. Фамилно заболяване се установява при поне 30-50% от пациентите, като в някои семейства всички засегнати роднини фенотипно проявяват ЛНКМП, за разлика от други фамилии, в които при други засегнати роднини се установява ХКМП, ДКМП или РКМП [16, 17]. Унаследяването на ЛНКМП е основно по автозомно-доминантен модел, но е възможно ав-

gene, encoding the largest protein in the heart – titin, are responsible for ~25% of familial cases and 18% of sporadic cases of DCM [15]. Pathogenic variants in the *LMNA* gene represent the second most frequently reported cause of DCM and are found in 6% of patients [11]. Mutations in each of the other genes, associated with DCM, appear to cause less than 5% of the cases of the disease – e.g. *MYH7* (~4%), *MYBPC3*, *TNNT2*, *MYPN*, *SCN5A*, *RBM20* (~2% each) and *PLN* (~1%) [16]. DCM is most commonly inherited in an autosomal dominant pattern, although autosomal recessive, X-linked or mitochondrial inheritance is possible.

Arrhythmogenic cardiomyopathy (ACM) is a progressive, inherited disease of the myocardium, which is a leading cause of ventricular arrhythmia and sudden cardiac death (SCD) in young adults [17]. ACM can affect primarily the right ventricle (ARVC), primarily the left ventricle (ALVC), or both ventricles of the heart. The prevalence of ACM is estimated to be 1:5000 and higher in cohorts of Italian and German origin (1:2000) [18]. In approximately 50% of ACM patients, pathogenic variants are found in the desmosomal genes, including *PKP2*, *DSP*, *DSG2*, *DSC2*, and *JUP*, and mutations in the *PKP2* gene, encoding the plakophilin-2 protein, have been reported most commonly – in 20-45% of patients [19]. ACM is most often inherited in an autosomal dominant pattern, while autosomal recessive forms are rare and are mainly associated with the cardiocutaneous syndromes of Naxos and Carvajal, which are caused by homozygous mutations in the *JUP* and *DSP* genes, respectively [17, 20]. Pathogenic mutations in the *DES*, *FLNC*, *PLN*, *SCN5A* and *TMEM43* genes have also been reported in patients with ACM [20].

Left ventricular non-compaction cardiomyopathy (LVNC) is a rare disease associated with multiple trabeculations in the left ventricular myocardium [21]. It is thought to be due to an arrest of the myocardial compaction at a late stage of fetal heart development, but it can also be acquired – besides familial and sporadic forms, it is found in trained athletes, in patients with sickle cell disease and in pregnant women [16, 21]. The prevalence of LVNC ranges from 0.14% and 1.26% in patients, referred for echocardiography, according to data from various studies, and is associated with 9.5% of cases of cardiomyopathy in children [21]. Familial disease is found in at least 30–50% of the patients, and in some families all affected relatives phenotypically exhibit LVNC, while in other families the affected relatives are found to have HCM, DCM or RCM [16, 17]. The inheritance of LVNC is mainly in an autosomal dominant pattern, but an autosomal recessive, X-linked or

тозомно-рецесивно, X-свързано или митохондриално унаследяване [17]. Най-често докладваните мутации при пациенти с ЛНКМП са в саркомерните гени, включително *MYH7*, *MYBPC3* и *TTN*, като честотата им е между 17 и 41%, а редки патогенни варианти са съобщени в *LDB3*, *NKX2.5*, *TBX5*, *PRDM16*, *SCN5A* и други гени [19, 22]. Мутациите в гена за тафазин са първите, открити при деца с фамилна ЛНКМП с X-свързано рецесивно унаследяване без данни за вродено сърдечно заболяване [23].

Рестриктивната кардиомиопатия (РКМП) е рядка кардиомиопатия, която може да е в резултат на генетични, негенетични причини или да се свързва със системни заболявания [19]. Унаследяването при РКМП може да е автозомно-доминантно, автозомно-рецесивно, X-свързано или митохондриално. Най-често откриваните мутации при пациентите с РКМП са в саркомерните и цитоскелетните гени, включително *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *ACTC1*, *TTN*, и *FLNC*. Възможно е роднините в едно семейство с фамилна РКМП да проявяват различни фенотипове, като ХКМП при наличието на патогенни варианти в *MYH7* или *TNNI3* гените, включително атриовентрикулен блок и/или скелетна миопатия [24]. Данните при пациенти с РКМП показват, че генетични находки вероятно могат да се установят в до 60% от случаите [19].

Актуалните клинични ръководства препоръчват провеждането на генетично консултиране и генетични изследвания като незаменяема част от комплексния подход в съвременната грижа за пациентите с кардиомиопатия и техните семейства [6, 19, 25-28]. Генетичните изследвания в клиничната практика имат ключово значение за потвърждаване на диагнозата при клинична несигурност, като идентифицираните генетични варианти могат да послужат за провеждането на каскаден скрининг с цел определяне на близки родственици в риск от развитие на заболяването или изключване на този риск при други от тях в съответствие със съвременните клинични препоръки.

Към момента, доколкото ни е известно, не са публикувани обобщени данни относно молекулярногенетичните характеристики при пациенти с кардиомиопатия в българската популация.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е одобрено от *Комисията по етика* към Медицинския университет – София, Протокол №17/16.12.2022 г. Писмени информирани съгласия са получени от пациентите, включени в проучването, или от техните настойници, както и от всички изследвани роднини.

Демографските и клиничните данни на пациентите бяха установени от придружаващата медицинска документация. Пробите с венозна кръв бяха събрани

mitochondrial inheritance is also possible [17]. The most commonly reported mutations in patients with LVNC are in the sarcomeric genes, including *MYH7*, *MYBPC3*, and *TTN*, with frequencies between 17% and 41%, while rare pathogenic variants have been reported in *LDB3*, *NKX2.5*, *TBX5*, *PRDM16*, *SCN5A*, and other genes [19, 22]. Mutations in the tafazzin gene were the first to be identified in children with familial LVNC with X-linked recessive inheritance with no evidence of congenital heart disease [23].

Restrictive cardiomyopathy (RCM) is a rare cardiomyopathy that may result from genetic, non-genetic causes, or be associated with systemic diseases [19]. Inheritance of RCM may be autosomal dominant, autosomal recessive, X-linked, or mitochondrial. The most commonly detected mutations in patients with RCM are in the sarcomeric and cytoskeletal genes, including *MYH7*, *TNNI3*, *TNNT2*, *ACTC1*, *TTN*, and *FLNC*. It is possible that relatives in a family with familial RCM exhibit different phenotypes, such as HCM in the presence of pathogenic variants in the *MYH7* or *TNNI3* genes, including atrioventricular block and/or skeletal myopathy [24]. Data in patients with RCM indicate that genetic findings are likely to be established in up to 60% of cases [19].

Current clinical guidelines recommend genetic counseling and genetic testing as an indispensable part of the complex approach in contemporary care for patients with cardiomyopathy and their families [6, 19, 25-28]. Genetic testing in clinical practice is key to confirming the diagnosis in clinical uncertainty, and the identified genetic variants may facilitate cascade screening to identify close relatives at risk of developing the disease or exclude this risk in others in accordance with up-to-date clinical recommendations.

At present, to the best of our knowledge, no pooled data on the molecular-genetic characteristics of patients with cardiomyopathy in the Bulgarian population has been published.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the *Ethics Committee* of the Medical University of Sofia, Protocol No 17/16.12.2022. Written informed consent was obtained from the patients included in the study or their guardians, as well as from all relatives tested.

Patient's demographic and clinical data were retrieved from the accompanying medical records. The samples with venous blood were collected during

по време на хоспитализация или на рутинно проследяване на пациентите в Клиниката по кардиология към УМБАЛ „Св. Анна“ – София, или в други университетски, или клинични центрове в страната.

За целите на настоящото проучване беше изолирана ДНК от венозна кръв на 20 български пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия, по метода на изсолване. Оценка на качеството на изолираната ДНК се осъществява чрез директна спектрофотометрия.

Цялостното екзомно секвениране (WES, whole exome sequencing) беше проведено в партньорска лаборатория „Admera Health, LLC“, USA. Анализът на данните от цялостното екзомно секвениране бе извършен със специфичен софтуер GensearchNGS, PhenoSystems SA с използването на разширен панел от 242 гена, свързани с кардиомиопатия и допълнителен таргетен панел от 20 гена, асоциирани с наследствена амилоидоза, при двама пациенти.

Таргетните региони от човешкия геном, където попадат генетични варианти, открити при цялостното екзомно секвениране, бяха намножени чрез полимеразна верижна реакция. Амплифицираните фрагменти бяха секвенирани по метода на Sanger с кит за секвениране BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Електрофоретичното разделяне на секвенционните продукти се извърши посредством секвенатор ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer. Получените данни бяха обработени автоматично от програма ABI3130 Data Collection Software и получени в готов вид под формата на електрофореграма със софтуер Sequencing Analysis v.5.1.1.

Интерпретацията на откритите генетични варианти е извършена според класификационните критерии на ръководството на *Американския колеж по медицинска генетика и геномика/Асоциацията по молекулярна патология (ACMG/AMP)*, като се вземат предвид клиничните прояви при пациентите и резултатите от проведените сегрегационни анализи в засегнатите семейства [29].

РЕЗУЛТАТИ

В рамките на настоящото проучване бяха изследвани общо 20 български пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия, както следва: 12 пациенти с ХКМП, включително 1 педиатричен пациент, 6 пациенти с ДКМП, от които 2-ма педиатрични, и 2-ма пациента с РКМП. Демографските и клиничните характеристики на изследваните лица са представени в табл. 1-5, а установените генетични находки при проучваната група са представени в табл. 6. Резултатите от проведеното проучване показват наличието на генетични варианти при 18 от изследваните български пациенти, като изчислената честота на генетичните находки, коя-

hospitalizations or routine follow-up of patients in the Cardiology clinic at the University Hospital "St. Anna", Sofia or in other university or clinical centers in the country.

For the purpose of this study, DNA from venous blood of 20 Bulgarian patients, diagnosed with cardiomyopathy, was isolated using the salting-out method. Assessment of the quality of the extracted DNA was carried out by direct spectrophotometry.

Whole exome sequencing (WES) was conducted in the partner laboratory "Admera Health, LLC", USA. The analysis of the whole exome sequencing data was performed with the specialized software GensearchNGS, PhenoSystems SA, using an expanded panel of 242 genes, associated with cardiomyopathy, and an additional target panel of 20 genes, associated with hereditary amyloidosis, in two of the patients.

The target regions of the human genome, where the genetic variants were found during the whole exome sequencing, were multiplied by polymerase chain reaction. The amplified fragments were sequenced using Sanger's method with BigDye® Terminator v.3.1 sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electrophoretic separation of sequence products was performed via an ABI Prism 3130 Sequence Genetic Analyzer sequencer. The obtained data were processed automatically by the program ABI3130 Data Collection Software and received in the form of an electrophoregram with Sequencing Analysis software v.5.1.1.

The interpretation of the detected genetic variants was performed according to the classification criteria of the guidelines of the *American College of Medical Genetics and Genomics/Association of Molecular Pathology (ACMG/AMP)*, taking into account the patient's clinical manifestations and the results of the segregation analyses conducted in the affected families [29].

RESULTS

In the present study, a total of 20 Bulgarian patients, diagnosed with cardiomyopathy, were examined, as follows: 12 patients with HCM, including 1 pediatric patient, 6 patients with DCM of whom 2 pediatric patients, and 2 patients with RCM. The demographic and clinical characteristics of the studied patients are presented in Tables 1-5, and the identified genetic findings in the study group are presented in Table 6. The results of the conducted study show the presence of genetic variants in 18 of the tested Bulgarian patients, and the calculated frequency of

то включва патогенни/вероятно патогенни варианти и вариантите с неясно значение (variants with uncertain significance, VUS), в тази пациентска група е 90%. Честотата на новооткритите генетични находки, които не са докладвани в базата данни ClinVar или литературните източници, при проучваната група пациенти е 25%. Генетичните находки при изследваните лица могат да се класифицират, съответно като:

- патогенни/вероятно патогенни варианти при 12 пациенти (60%);
- варианти с неясно значение при 6 пациенти (30%).

Единствено при пациентите с РКМП в проучването не се установяват генетични находки, свързани с изявената клинична симптоматика (10%). Патогенни/вероятно патогенни варианти се откриват при ~58% от пациентите с ХКМП и при ~83% от пациентите с ДКМП. Изчислената честота на вероятно патогенни/патогенни варианти в проучването е ~32% от всички открити варианти, като честотите при пациентите с ХКМП и ДКМП са съответно 28% и ~38%.

По отношение на типовете открити генетични варианти при всички пациенти, с най-висока честота се установяват missense варианти (~69%), а по-рядко се откриват nonsense варианти (~14%), варианти с изместване на рамката на четене (~8%), in-frame делеции (~6%), както и start loss вариант (~3%). Честотите при пациентите с ХКМП и ДКМП са разпределени, както следва:

- ХКМП – missense варианти ~74%; nonsense варианти ~13%; варианти с изместване на рамката на четене ~9% и in-frame делеция ~4%;
- ДКМП – missense варианти ~62%; nonsense варианти ~15%; вариант с изместване на рамката на четене, in-frame делеция и start loss вариант ~8% за всеки тип.

На фиг. 1 са представени резултатите по отношение на честотата на патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение, както и само на патогенни/вероятно патогенни варианти при изследваната група пациенти, а също и резултатите от анализа при подгрупите с ХКМП и ДКМП. Получените резултати за честотата на генетичните варианти (общо патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение), установени при българските пациенти с кардиомиопатия, показват че най-често се засягат саркомерните гени (*TTN*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *MYH7*, *MYH6*) – в половината от случаите, гени за йонни канали (*SCN5A*, *KCNA5*, *KCNH2*, *CACNA1C*), цитоскелетни гени (*LAMA4*, *ILK*, *FLNC*), гени за Z-диска (*TCAP*, *MYPN*), гени за митохондриални протеини (*TAZ*, *NDUFB11*), но също така и гени за клетъчно-адхезионен протеин (*CDH2*), десмосомните структури (*DSP*), клетъчен мембранен протеин (*ANK2*) и за специфични рецепторни молекули (*LDLR*, *IL31RA*).

the genetic findings, which includes pathogenic/likely pathogenic variants and variants with uncertain significance (VUS) in this patient group is 90%. The frequency of newly discovered genetic findings not reported in the ClinVar database or literature sources in the study group of patients is 25%. The genetic findings in the studied patients can be classified as:

- pathogenic/likely pathogenic variants in 12 patients (60%);
- variants with uncertain significance in 6 patients (30%).

Only in the patients with RCM, no genetic findings related to the manifested clinical symptoms were identified (10%). Pathogenic/likely pathogenic variants were found in ~58% of the patients with HCM and in ~83% of the patients with DCM. The estimated frequency of likely pathogenic/pathogenic variants in the study was ~32% of all variants found, with the frequency in patients with HCM and DCM being 28% and ~38%, respectively.

Regarding the types of genetic variants found in all patients, missense variants (~69%) were with the highest frequency, while nonsense variants (~14%) were less common, as well as frameshift variants (~8%), in-frame deletions (~6%) and a start loss variant (~3%). The frequencies in patients with HCM and DCM are distributed, as follows:

- HCM – missense variants ~74%; nonsense variants ~13%; frameshift variants ~9% and in-frame deletion ~4%;
- DCM – missense variants ~62%, nonsense variants ~15%; frameshift variants, in-frame deletion and start loss variant ~8% for each type.

The results about the frequency of pathogenic/likely pathogenic variants and variants with uncertain significance, only of the pathogenic/likely pathogenic variants in the studied patient group, and also the results of the analyses in the subgroups of patients with HCM and DCM are presented in Figure 1. The results about the frequency of the genetic variants (all pathogenic/likely pathogenic variants and variants with uncertain significance) found in the Bulgarian patients with cardiomyopathy show that the most commonly affected genes were the sarcomeric genes (*TTN*, *MYBPC3*, *TNNI3*, *MYH7*, *MYH6*) – in half of the cases, ion channel genes (*SCN5A*, *KCNA5*, *KCNH2*, *CACNA1C*), cytoskeletal genes (*LAMA4*, *ILK*, *FLNC*), Z-disc genes (*TCAP*, *MYPN*), genes for mitochondrial proteins (*TAZ*, *NDUFB11*), as well as genes for cell-adhesion protein (*CDH2*), desmosome structures (*DSP*), cell membrane protein (*ANK2*) and for specific receptor molecules (*LDLR*, *IL31RA*).

Таблица 1. Демографски и клинични характеристики на изследваните възрастни пациенти с хипертрофична кардиомиопатия

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the adult patients with hypertrophic cardiomyopathy

Идентификация на пациента Patient identification	Пол Sex	Възраст, години Age, years	Етническа принадлежност Ethnicity	ХМП, тип Type of cardiomyopathy	Тип ЛК хипертрофия Type of LV hypertrophy	Алкохолна аблация/реаблация на септума Alcohol ablation/reablation of the septum	Имплантиран ICD, индикация Implanted ICD, indication	Имплантиран пейсмейкър, индикация Implanted pacemaker, indication	Дебелина на междукламерна преграда (mm) Interventricular septal thickness (mm)	Дебелина на задна стена на лява камера (mm) Posterior wall of the LV thickness (mm)	Фракция на изтласкване на лява камера (%) LV Ejection fraction (%)	Теледиастолен обем на лява камера (ml) End-diastolic volume of the LV (ml)	Телесистолен обем на лява камера (ml) End-systolic volume of the LV (ml)
Пациент № 1 Patient № 1	M	57	Българска Bulgarian	ХМП, неструктивна HCM, non-obstructive	Асиметрична // Asymmetric		Да, рецидивираща камерна тахикардия Yes, recurrences of ventricular tachycardia		15 mm	13 mm	45%	149 ml	80 ml
Пациент № 2 Patient № 2	Ж/Ф	60	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Концентрична Concentric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation		Да, симптоматична сърдечна недостатъчност Yes, symptomatic heart failure	19 mm	15 mm	65%	48 ml	17 ml
Пациент № 3 Patient № 3	M	41	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation			21 mm	14 mm	73%	128 ml	34 ml
Пациент № 4 Patient № 4	M	66	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation			19 mm	13 mm	62%	64 ml	25 ml
Пациент № 5 Patient № 5	M	60	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation		Да, пълен AV блок и клинични прояви на MAS синдром Yes, complete AV block and clinical presentation with MAS syndrome	22 mm	16 mm	65%	85 ml	30 ml
Пациент № 6 Patient № 6	Ж/Ф	45	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric				17 mm	22 mm	66%	48 ml	17 ml
Пациент № 7 Patient № 7	Ж/Ф	63	Турска Turkish	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation			24 mm	19 mm	54%	85 ml	40 ml
Пациент № 8 Patient № 8	M	28	Турска Turkish	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric		Да, профилактика на ВСС Yes, SCD prophylaxis		24 mm	22 mm	52%	58 ml	28 ml
Пациент № 9 Patient № 9	M	34	Българска Bulgarian	ХМП, обструктивна HCM, obstructive	Асиметрична Asymmetric	Да, перкутанна аблация на септума Yes, percutaneous septal ablation			23 mm	16 mm	67%	98 ml	26 ml
Пациент № 10 Patient № 10	M	33	Българска Bulgarian	ХМП, неструктивна HCM, non-obstructive	Асиметрична Asymmetric				17 mm	12 mm	77%	81 ml	24 ml
Пациент № 11 Patient № 11	Ж/Ф	41	Турска Turkish	ХМП, неструктивна HCM, non-obstructive	Асиметрична Asymmetric				29 mm	24 mm	70%	88 ml	26 ml

Таблица 1. Продължение

Table 1. Continuation

Идентификация на пациента Patient identification	Диастолическа дисфункция на лява камера, степен Diastolic dysfunction of the LV, grade	Ляво предсърдие, предно-заднен размер (mm) Left atrium, anterior-posterior size (mm)	Деснокамерна хипертрофия, дебелина на деснокамерна стена (mm) Right ventricular hypertrophy, right ventricular free wall thickness (mm)	Митрална регургитация, степен Mitral insufficiency, degree	Сърдечна недостатъчност, клас по NYHA Heart failure, NYHA class	Артериална хипертония, степен Arterial hypertension, grade	Предсърдно мъждане, тип Atrial fibrillation, type	Възраст на откриване на заболяването, години Age of disease detection, years	Фамилна анамнеза за КМП или ВСС Family history for CMP or SCD	Други клинични характеристики Other clinical characteristics
Пациент № 1 Patient № 1		51 mm		II	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class	Да, II ст. Yes, II gr.		55	Негативна Negative	Електрическа буря. Успешна алкохолна аблация на субстрат на камерна тахикардия. Неуспешна радиочестотна аблация на аритмогенен субстрат от ендокарда на латералната страна на ЛК. Фиброза горно-латерално на лява камера. Умерена трикуспидална инсуфициенция. Пулмонална хипертония. Необструктивна коронарна болест. Състояние след двустранна симпатикотомия. Състояние след подмяна на генератор на ICD. Камерен отказ. Летален изход. Electric storm. Successful alcohol ablation of a substrate for ventricular tachycardia. Failed radiofrequency ablation of an arrhythmogenic substrate at the endocardium on the lateral side of the left ventricle. Fibrosis of the upper-lateral wall of the left ventricle. Moderate tricuspid insufficiency. Pulmonary hypertension. Non-obstructive coronary artery disease. Bilateral sympathectomy. Replacement of ICD generator. Left ventricular failure. Lethal outcome.
Пациент № 2 Patient № 2	III ст./gr.	47 mm		I	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class	Да, III ст. Yes, III gr.		59	Негативна Negative	Състояние след синкопи. Несигнификантна каротидна атероматоза. Мозъчно-съдова болест. Състояние след хистеректомия. Имплантиран постоянен пейсмейкър като допълващо лечение към септумредуциращата терапия. Syncope. Non-significant carotid atherosclerosis. Cerebrovascular disease. Hysterectomy. Implanted permanent pacemaker as an adjunct treatment to septum reduction therapy.
Пациент № 3 Patient № 3		57 mm		I				34	Негативна Negative	Епизод на предсърдно мъждане. Баща, починал на 56-годишна възраст от сърдечно заболяване. Episode of atrial fibrillation. A father who died at the age of 56 from a heart disease.
Пациент № 4 Patient № 4		50 mm		II-III	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class	Да, III ст. Yes, III gr.		61	Негативна Negative	Захарен диабет тип II. Баща, починал на 37-годишна възраст от сърдечно заболяване. Type II diabetes mellitus. A father who died at the age of 37 from a heart disease.
Пациент № 5 Patient № 5	III ст./gr.	53 mm		0-I	Да, II-III клас по NYHA Yes, NYHA II-III class	Да, III ст. Yes, III gr.	Да, пристъпно Yes, paroxysmal	52	Негативна Negative	Дислипидемия. Холелитиаза. Dyslipidemia. Cholelithiasis.
Пациент № 6 Patient № 6		46 mm		II-III	Да, II клас по NYHA Yes, NYHA II class	Да, II ст. Yes, II gr.		44	Негативна Negative	Силно табелуларизирана ЛК. Pronounced tabularization of the LV.
Пациент № 7 Patient № 7	III ст./gr.	50 mm		II	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class			60	Негативна Negative	
Пациент № 8 Patient № 8	III ст./gr.	56 mm		II			Да, персистиращо Yes, persistent	21	Позитивна - леля с ВСС Positive - an aunt with SCD	Перикарден излив - хемодинамично незначим. Умерена трикуспидална инсуфициенция. Пулмонална хипертония. Тахикардия при предсърдно мъждане с давност около 10 дни. Тромбоза в левопредсърдното ухо. Hemodynamically insignificant pericardial effusion. Moderate tricuspid insufficiency. Pulmonary hypertension. Tachyarrhythmic atrial fibrillation with duration of about 10 days. Thrombosis of the left atrial appendage.
Пациент № 9 Patient № 9		49 mm		I-II	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class			30	Негативна Negative	Синкопи при уикли. Дилатирано дясно предсърдие. Майка починала на 54-годишна възраст, баща - на 53-годишна, сестра - на 50-годишна и брат - на 49-годишна. Syncope at exertion. Dilated right atrium. Mother died at the age of 54, father - at 53 years old, sister - at 50 years old, and brother - at 49 years old.
Пациент № 10 Patient № 10		47 mm		I				33	Позитивна - майка с ЛНКМП Positive - a mother with LVNC	
Пациент № 11 Patient № 11	III ст./gr.	44 mm	11 mm	I	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class	Да, II ст. Yes, II gr.		41	Негативна Negative	Перикарден излив без компресия на камери. Съмнение за инфилтративна кардиомиопатия. Редки единични камерни екстрасистолни с 2 различни морфологии, кратък епизод на неправилна широкоексиклетна тахикардия, без сингификантни паузи, траен бедрен блок. Анемичен синдром. Миома на матката. Сестрата на пациентката е с ИБС и тиреоидит на Хашимото. Pericardial effusion without compression of chambers. Suspected infiltrative cardiomyopathy. A small number of ventricular extrasystoles with 2 different morphologies, a short episode of irregular broad-complex tachycardia, permanent bundle branch block, no significant R-R pauses. Anemic syndrome. Uterine myoma. The patient's sister had coronary artery disease and Hashimoto's thyroiditis.

Използвани съкращения: AV – атриовентрикулен; ВСС – внезапна сърдечна смърт; ИБС – исхемична болест на сърцето; ICD – имплантируем кардиовертер дефибрилатор; КМП – кардиомиопатия; ЛНКМП – левокамерна некомпактна кардиомиопатия; ЛК – лява камера; MAS синдром – синдром на Morgagni-Adams-Stokes; ХКМП – хипертрофична кардиомиопатия.

Abbreviations: AV – atrio-ventricular; SCD – sudden cardiac death; IHD – ischaemic heart disease; ICD – implantable cardioverter defibrillator; CMP – cardiomyopathy; LVNC – left ventricular non-compaction cardiomyopathy; LV – left ventricle; MAS syndrome – Morgagni-Adams-Stokes syndrome; HCM – hypertrophic cardiomyopathy.

Таблица 2. Демографски и клинични характеристики на изследваната педиатрична пациентка с хипертрофична кардиомиопатия
Table 2. Demographic and clinical characteristics of the pediatric patient with hypertrophic cardiomyopathy

Идентификация на пациента Patient identification	Пол Sex	Възраст, години Age, years	Етническа принадлежност Ethnicity	КМП, тип Type of cardiomyopathy	Тип ЛК хипертрофия Type of LV hypertrophy	Дебелина на междукамберна преграда Interventricular septal thickness (mm)	Дебелина на задна стена на лява камера Posterior wall of the LV thickness (mm)	Фракция на изгласване на лява камера (%) LV Ejection fraction (%)	Теледиастолен обем на лява камера (ml) End-diastolic volume of the LV (ml)	Телесистолен обем на лява камера (ml) End-systolic volume of the LV (ml)	Диастолен дисфункция на лява камера, степен Diastolic dysfunction of the LV, grade	Ляво предсърдие, предно-заднен размер (mm) Left atrium, anterior-posterior size (mm)	Митрална регургитация, степен Mitral insufficiency, degree	Сърдечна недостатъчност, клас по NYHA Heart failure, NYHA class	Възраст на откриване на заболяването, години Age of disease detection, years	Фамилна анамнеза за КМП или ВСС Family history for CMP or SCD	Други клинични характеристики Other clinical characteristics
Пациент № 12 Patient № 12	Ж/Ф	17	Българска Bulgarian	ХКМП, обструктивна НСМ, obstructive	Асиметрична Asymmetric	19 mm	13 mm	86%	103 ml	14,6 ml	III	57 mm	III	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class	13	Негативна Negative	Наднормено тегло Overweight

Използвани съкращения: ВСС, внезапна сърдечна смърт; КМП, кардиомиопатия; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия;
Abbreviations: SCD, sudden cardiac death; CMP, cardiomyopathy; LV, left ventricle; HCM, hypertrophic cardiomyopathy

Таблица 3. Демографски и клинични характеристики на изследваните възрастни пациенти с дилатативна кардиомиопатия
Table 3. Demographic and clinical characteristics of the patients with dilated cardiomyopathy

Идентификация на пациента Patient identification	Пол Sex	Възраст, години Age, years	Етническа принадлежност Ethnicity	МП, тип Type of cardiomyopathy	Имплантиран ICD, индикация Implanted ICD, indication	Дебелина на междуперастна преграда (mm) Interventricular septal thickness (mm)	Дебелина задна стена на лява камера (mm) Posterior wall of the LV thickness (mm)	Фракция на изтласкване на лява камера (%) LVEF fraction (%)	Телестостен размер на лява камера (mm) End-systolic dimension of the LV (mm)	Телестостен обем на лява камера (ml) End-systolic volume of the LV (ml)	Телестостен обем на лява камера (ml) End-diastolic volume of the LV (ml)	Ляво предсърдие, предсърден размер (mm) Left atrium, anterior-posterior size (mm)	Мигрална регургитация, степен Mitral regurgitation, degree	Сърдечна недостатъчност, клас по NYHA Heart failure, NYHA class	Артериална хипертония, степен Arterial hypertension, grade	Предсърдно мъждене, тип Atrial fibrillation, type	Възраст на откриване на заболяването, години Age of disease detection, years	Фамилна анамнеза за КМП или ВСС Family history for CMP or SCD	Други клинични характеристики Other clinical characteristics
Пациент № 13 Patient № 13	Ж/Ф	25	Ромска Roma	ДКМП DCM		13 mm	11 mm	37%	59 mm	87 ml	133 ml	46 mm	I	Да II клас по NYHA Yes, NYHA-II class	Да, пристъпно Yes, paroxysmal		24	Позитивна, сестер Positive – sister with HCM	Ритмично-проводно нарушение. Състояние след инфаркт. Състояние след перипартална лява камера тахикардия. Състояние след тешавиция ляво. Хипертония. Железодифицитна анемия. Rhythm and conduction disturbances. Syncope. Non-sustained ventricular tachycardia. Past left-side preinfarct. Hypertension. Iron deficiency anemia.
Пациент № 14 Patient № 14	М	54	Българска Bulgarian	ДКМП/Идиопатична кардиомиопатия, неясно DCM/idiopathic cardiomyopathy, unspecified		14 mm	10 mm	37%	54 mm	70 ml	111 ml	43 mm	0-I	Да I клас по NYHA Yes, NYHA-I class	Да II ст. Yes, II st.		53	Негативна Negative	Ритмично-проводно нарушение. Състояние след инфаркт. Епизод на ватна камера тахикардия. ЛББ. Състояние след COVID-19 инфекция. Хроничен вирусен В-хепатит. Лимфоцитоза. Хаважцион на черен дроб. Често то башна левия с установена АА амилоидоза, която е отключващо събитие на бъбречна недостатъчност и сърдечна декомпенсация. Rhythm and conduction disturbances. Syncope. An episode of non-sustained ventricular tachycardia. LBBB. Past COVID-19 infection. Chronic viral B hepatitis. Lymphocytosis. Hepatomegaly of liver. Arterialuncle with established AA amyloidosis, who died of kidney failure and cardiac decompensation.
Пациент № 15 Patient № 15	М	31	Българска Bulgarian	ДКМП DCM		9.2 mm	10 mm	34%	59.7 mm	78 ml	118 ml	57.7 mm	I-II	Да II клас по NYHA Yes, NYHA-II/III class			25	Позитивна – брат, починал на 13 год. със същите симптоми Positive – brother deceased at 13 years of age with same symptoms	Дистална мигрална. Превенен инулт. Екстрасистолна аритмия. Distal myopathy. Past myocardial infarct. Extrasystolic arrhythmia.
Пациент № 16 Patient № 16	М	44	Българска Bulgarian	ДКМП DCM	Да, камера тахикардия Yes, ventricular tachycardia	11 mm	9 mm	41%	59 mm	102 ml	176 ml	31 mm	0-I	Да II клас по NYHA Yes, NYHA-II/III class			28	Позитивна – майка с ДКМП Positive – mother with DCM	Два епизода на непроходливата камера тахикардия с морфология на ДББ и полиморфни камерни екстрасисти. Предходни 3 синкопа. Частична некомпетентност на ПК и обширна зона на фиброза в миокарда. Почувана фракция на изтласкване на лява камера – 33.5%. Two episodes of non-sustained ventricular tachycardia with RBBB morphology and polymorphic ventricular extrasystoles. Previous 3 syncope. Partial LV non-contraction and extensive fibrotic areas in the myocardium. Reduced right ventricular ejection fraction – 33.5%.

Използвани съкращения: ВСС – внезапна сърдечна смърт; ДББ – десен бедрен блок; ДКМП – дилатативна кардиомиопатия; ICD – имплантируем кардиовертер дефибрилатор; КМП – кардиомиопатия; ЛББ – ляв бедрен блок; ПК – лява камера; ХКМП, хипертрофична кардиомиопатия.

Abbreviations: SCD – sudden cardiac death; RBBB – right bundle branch block; DCM – dilated cardiomyopathy; ICD – implantable cardioverter defibrillator; CMP – cardiomyopathy; LBBB – left bundle branch block; LV – left ventricle; HCM – hypertrophic cardiomyopathy.

Таблица 4. Демографски и клинични характеристики на изследваните педиатрични пациенти с дилатативна кардиомиопатия
 Table 4. Demographic and clinical characteristics of the pediatric patients with dilated cardiomyopathy

Идентификация на пациента Patient identification	Пол Sex	Възраст, години Age, years	Етническа принадлежност Ethnicity	КМП, тип Type of cardiomyopathy	Фракция на изтласкване на лява камера (%) LV Ejection fraction (%)	Митрална регургитация, степен Mitral insufficiency, degree	Възраст на откриване на заболяването, години Age of disease detection, years	Фамилна анамнеза за КМП или ВСС Family history for CMP or SCD	Други клинични характеристики Other clinical characteristics
Пациент № 17 Patient № 17	M	0	Българска Bulgarian	ДКМП DCM	30%	III	0 год. (14-дневно новородено) 0 years (14-days old neonate)	Негативна Negative	Сърдечна недостатъчност. Кардиогенен шок. Кардиомегалия с кардиоторакален индекс 0.7. Хепатомегалия. Инфекциозен синдром. Метаболитна ацидоза. Лява камера с глобулозна форма и индиректни данни за левокамерна некомпактност. Heart failure. Cardiogenic shock. Cardiomegaly with cardiothoracic index 0.7. Hepatomegaly. Infectious syndrome. Metabolic acidosis. Globulous-shaped left ventricle and indirect data for left ventricular non-compaction.
Пациент № 18 Patient № 18	Ж/Ф	0	Българска Bulgarian	ДКМП DCM	30%	II	0 год. (3-месечно кърмаче) 0 years (3-months old infant)	Негативна Negative	Сърдечна недостатъчност. Кардиогенен шок. Камерна тахикардия. Некомпактна лява камера. Пренатално установена надкамерна екстрасистолия в 33 г.с. С трудно овладяващи се епизоди на тяснокомплексна и ширококомплексна тахикардия от втори ден след раждането и депресия на левокамерната систолна функция. Поради изчерпване на консервативните възможности за лечение при подложка кардиомиопатия, при детето е осъществена сърдечна трансплантация. Детето е живо, без белези на сърдечна недостатъчност и без ритмично-проводни нарушения. Heart failure. Cardiogenic shock. Ventricular tachycardia. Left ventricular non-compaction. Prenatally registered supraventricular extrasystoles at 33 gestational weeks. With difficult to control episodes of narrow-complex and wide-complex tachycardia from the second postnatal day and reduced left ventricular systolic function. Due to the exhaustion of conservative treatment options for the underlying cardiomyopathy, a heart transplantation was performed. The child survived, with no signs of heart failure or rhythm and conduction disturbances.

Използвани съкращения: ВСС – внезапна сърдечна смърт; ДКМП – дилатативна кардиомиопатия; КМП – кардиомиопатия

Abbreviations: SCD – sudden cardiac death; DCM – dilated cardiomyopathy; CMP – cardiomyopathy; LV – left ventricle

Таблица 5. Демографски и клинични характеристики на изследваните възрастни пациенти с рестриктивна кардиомиопатия

Table 5. Demographic and clinical characteristics of the adult patients with restrictive cardiomyopathy

Идентификация на пациента Patient identification	Пол Sex	Възраст, години Age, years	Етническа принадлежност Ethnicity	КМП, тип Type of cardiomyopathy	Дебелина на междукамерна преграда (mm) Interventricular septal thickness (mm)	Дебелина на задна стена на лява камера (mm) Posterior wall of the LV thickness (mm)	Фракция на изтласкване на лява камера (%) LV Ejection fraction (%)	Теледиастолен размер на лява камера (mm) End-diastolic dimension (mm)	Телеистолен размер на лява камера (mm) End-systolic dimension of the LV (mm)	Теледиастолен обем на лява камера (ml) End-diastolic volume of the LV (ml)	Телеистолен обем на лява камера (ml) End-systolic volume of the LV (ml)	Диастолна дисфункция на лява камера, степен Diastolic dysfunction of the LV, grade	Ляво предсърдие, предно-заден размер (mm) Left atrium, anterior-posterior size (mm)	Митрална регургитация, степен Mitral insufficiency, degree	Сърдечна недостатъчност, клас по NYHA Heart failure, NYHA class	Артериална хипертензия, степен Arterial hypertension, grade	Предсърдно мъждене, тип Atrial fibrillation, type	Възраст на откриване на заболяването, години Age of disease detection, years	Фамилна анамнеза за КМП или ВСС Family history for CMP or SCD	Други клинични характеристики Other clinical characteristics
Пациент № 19 Patient № 19	Ж/Ф	19	България Bulgarian	РКМП RCM	7 mm	7 mm	20%	50 mm	46 mm	82 ml	62 ml	II	48 mm	II	Да, III клас по NYHA Yes, NYHA III class			19	Негативна Negative	На 20-дневна възраст установен междукамерен дефект в средна част на междукамерната преграда. На 5-годишна възраст – фиброзиране на същата структура без шънт. Умерена към тежка трикуспидална инсуфициенция. Пулмонална хипертензия. Силно отслабени до липсващи сухожилно-нервни рефлекс, но при запазена активна мускулна сила. Холецистит. At the age of 20 days an interventricular defect in the mid portion of the interventricular septum was registered. At the age of 5 years – fibrosis of the same defect without a shunt. Moderate to severe tricuspid insufficiency. Pulmonary hypertension. Severely decreased to absent tendon-nerve reflexes, but with preserved active muscle force. Cholecystitis.
Пациент № 20 Patient № 20	М	45	България Bulgarian	РКМП RCM	14.5 mm	10 mm	58%	51 mm	34 mm	129 ml	45 ml	III	56 mm	0-1	Да, III-IV клас по NYHA Yes, NYHA III-IV class	Да, II ст. Yes, II gr.	Да, перманентно Yes, permanent	44	Негативна Negative	ИБС. Нестабилна ангина пекторис акцелерирала. Микроваскуларна болест. Състояние след миокардит. Дилатирани десни кухини. Перикард – минимално отслабяване пред дясно предсърдие – 5 mm. Единични камерни екстрасистоли. Асцит. Улкус вентрикули и улкус дуодени. Хиатална херния. Чернодробна стеатоза. Желязодефицитна анемия. Обезитет. IHD. Unstable angina pectoris – accelerated angina. Microvascular disease. Past myocarditis. Dilated right chambers. Pericardium – minimal (5mm) separation in front of the right atrium. Rare ventricular extrasystoles. Ascites. Stomach ulcer and duodenal ulcer. Hiatal hernia. Hepatic steatosis. Iron deficiency anemia. Obesity.

Използвани съкращения: ВСС – внезапна сърдечна смърт; ИБС – исхемична болест на сърцето; КМП – кардиомиопатия; РКМП – рестриктивна кардиомиопатия

Abbreviations: SCD – sudden cardiac death; IHD – ischaemic heart disease; CMP – cardiomyopathy; LV – left ventricle; RCM – restrictive cardiomyopathy

Патогенни/вероятно патогенни варианти се установяват с най-висока честота в *MYBPC3* гена (50%), последвано от находките в гените за титин, β -миозиновата тежка верига, тропонин I, филамин C, тафазин и NDUFБ11 протеина (по 8% всеки) (фиг. 2). Резултатите от анализа за честотата на генетичните находки в подгрупата пациенти с ХКМП показват, че 55% от откритите патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение, и 100% от установените патогенни/вероятно патогенни варианти засягат саркомерните гени. В подгрупата на пациентите с ДКМП, патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение се установяват най-често в *TTN* гена (31%) и *SCN5A* гена (15%). Патогенни/вероятно патогенни варианти при пациентите с ДКМП се откриват в гени за протеини, участващи в саркомерната и цитоскелетната структура, както и функцията на митохондриите.

На фиг. 3 са представени резултатите от проведените сегрегационни анализи при 6 от засегнатите семейства в настоящото проучване.

Pathogenic/likely pathogenic variants were found with the highest frequency in the *MYBPC3* gene (50%), followed by the findings in the titin gene, the β -myosin heavy chain, troponin I, filamin C, tafazzin and the NDUFБ11 protein (8% each) (Figure 2). The results of the analysis of the frequency of genetic findings in the subgroup of patients with HCM showed that 55% of the identified pathogenic/likely pathogenic variants and variants with uncertain significance, and 100% of the identified pathogenic/likely pathogenic variants affected the sarcomeric genes. In the subgroup of patients with DCM, pathogenic/likely pathogenic variants and variants with uncertain significance were most commonly found in the *TTN* gene (31%) and *SCN5A* gene (15%). Pathogenic/likely pathogenic variants in the DCM patients were found in genes encoding proteins involved in the sarcomeric and cytoskeletal structure, as well as mitochondrial function.

The results of the segregation analyses conducted in 6 of the affected families in the present study are showed in Figure 3.

Таблица 6. Генетични варианти, установени при изследваните пациенти. Генетичните варианти, които са подчертани в таблицата, са новооткрити в настоящото изследване (не са докладвани в ClinVar или в литературните източници)

Table 6. Genetic variants, found in the studied patients. Genetic variants that are underlined in the table are newly discovered in the study (not reported in ClinVar or in the literature)

Идентификация на пациента Patient identification	Ген Gene	Вариант (UCSC, hg19); Промяна на ниво транскрипт; Промяна на ниво аминокиселини Variant (UCSC, hg19); Change at transcript level; Change at amino acid level	Тип на варианта Type of variant	Алелна честота (брой хомозиготни носители), докладвани в базата данни gnomAD v2.1.1. Allele frequency (number of homozygote carriers), reported in the gnomAD v2.1.1. database	In silico предиктори In silico predictors	АСМГ/АМР критерии АСМГ/АМР criteria	Зиготност Zygosity
Пациент № 1 Patient № 1	<i>TCAP</i>	Chr.17:g.37822171G>C; NM_003673.4: c.313G>C; p.Glu105Gln	Missense	0.00051 (0)	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, PP2, BP4)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>KCNH2</i>	Chr.7:g.150642476G>A; NM_000238.4: c.3457C>T; p.His1153Tyr	Missense	0.0000483 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PP2, PP5, BS2)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>KCNA5</i>	Chr.12:g.5153573G>A; NM_002234.4: c.260G>A; p.Arg87Gln	Missense	0.0003216 (0)	PolyPhen2: Benign; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Polymorphism	VUS (категория / category: BP4)	Хетерозигот Heterozygous
	<u><i>TTN</i></u>	<u>Chr.2:g.179647724G>A;</u> <u>NM_001267550.2: c.2909C>T;</u> <u>p.Pro970Leu</u>	Missense	-	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, PP3, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 2 Patient № 2	<i>TTN</i>	Chr.2:g.179613376_179613379delTTA; NM_133379.5: c.13748_13751del; p.Ile4583AsnfsTer5	Frameshift	0.00001203 (0)	Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PVS1, PM2)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>TTN</i>	Chr.2:g.179416834G>A; NM_001267550.2: c.90793C>T; p.Arg30265Trp	Missense	0.00009286 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>CACNA1C</i>	Chr.12:g.2797824C>T; NM_001167623.2: c.5996C>T; p.Thr1999Ile	Missense	0.00005381 (0)	PolyPhen2: Benign; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Polymorphism	VUS (категория / category: BP4)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 3 Patient № 3	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47369975C>T; NM_000256.3: c.772G>A; p.Glu258Lys	Missense	0.00002199 (0)	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	Патогенен / Pathogenic (категории / categories: PM2, PP2, PP3, PP5, PS3; PS4)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47364607C>T; NM_000256.3: c.1316G>A; p.Gly439Asp	Missense	0.000008102 (0)	PolyPhen2: Benign; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM1, PM2)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 4 Patient № 4	<i>TNNI3</i>	Chr.19:g.55665462C>T; NM_000363.5: c.485G>A; p.Arg162Gln	Missense	0.00004016 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	Патогенен / Pathogenic (категории / categories: PM1, PM2, PM5, PP5, PS3)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>LAMA4</i>	Chr.6:g.112463412G>A; NM_001105206.3: c.2576C>T; p.Thr859Met	Missense	0.00001989 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PP3, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>LAMA4</i>	Chr.6:g.112506534T>C; NM_001105206.3: c.982A>G; p.Arg328Gly	Missense	0.000003978 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous

Пациент № 5 Patient № 5	<i>LDLR</i>	Chr.19:g.11231092G>T; NM_000527.5: c.2034G>T; p.Gln678His	Missense	-	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM1, PM2)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 6 Patient № 6	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47353708delG; NM_000256.3: c.3729del; p.Cys1244AlafsTer87	Frameshift	0.000004013 (0)	Mutation Taster: Disease causing	Вероятно патогенен Likely pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 7 Patient № 7	<i>DSP</i>	Chr.6:g.7581384T>C; NM_004415.4: c.4961T>C; p.Leu1654Pro	Missense	0.00003191 (1)	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PP3, PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>TTN</i>	Chr.2:g.179403447A>G; NM_001267550.2: c.99109T>C; p.Tyr33037His	Missense	0.0002433 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 8 Patient № 8	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47353740G>A; NM_000256.3: c.3697C>T; p.Gln1233Ter	Nonsense	0.000008024 (0)	Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2, PP5)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 9 Patient № 9	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47354782C>T; NM_000256.3: c.3293G>A; p.Trp1098Ter	Nonsense	-	Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2, PP5)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 10 Patient № 10	<i>MYH7</i>	Chr.14:g.23893245_23893247delCTC; NM_000257.4: c.2791_2793del; p.Glu931del	In-frame deletion	-	Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PP1, PP4, PP5, PM1, PM2, PS3, PP3)	Хетерозигот (майчин произ- ход) Heterozygous (maternal origin)
Пациент № 11 Patient № 11	<i>MYH6</i>	Chr.14:g.23852501C>T; NM_002471.4: c.5594G>A; p.Arg1865Gln	Missense	0.00006768 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PP3, BS2)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>IL31RA</i>	Chr.5:g.55147420T>C; NM_139017.7: c.22T>C; p.Phe8Leu	Missense	0.00000406 (0)	PolyPhen2: Benign; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Polymorphism	VUS (категории / categories: PM2, BP4)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 12 Patient № 12	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47353626G>A; NM_000256.3: c.3811C>T; p.Arg1271Ter	Nonsense	0.000008126 (0)	Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2, PP3, PP5)	Хетерозигот (бащин произход) Heterozygous (paternal origin)
	<i>MYPN</i>	Chr.10:g.69934073T>C; NM_001256267.2: c.2224T>C; p.Ser742Pro	Missense	-	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категория / category: PM2)	Хетерозигот (бащин произход) Heterozygous (paternal origin)
Пациент № 13 Patient № 13	<i>MYBPC3</i>	Chr.11:g.47362758C>G; NM_000256.3: c.1828G>C; p.Asp610His	Missense	0.00006442 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	Вероятно патогенен Likely pathogenic (категории / categories: PM1, PM2, PP3, PP5)	Хетерозигот Heterozygous
	<i>TTN</i>	Chr.2:g.179665289C>T; NM_001267550.2: c.416G>A; p.Arg139Gln	Missense	0.00002388 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хомозигот Homozygous
	<i>ANK2</i>	Chr.4:g.114276826_114276831delAA GGTC; NM_001148.6: c.7054_7059del; p.Gly2352_Gln2353del	In-frame deletion	0.00009566 (0)	Mutation Taster: Polymorphism	VUS (категории / category: PM4)	Хетерозигот Heterozygous

Пациент № 14 Patient № 14	ILK	Chr.11:g.6631386G>C; NM_004517.4: c.1086G>C; p.Gln362His	Missense	0.00001591 (0)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
	CDH2	Chr.18:g.25565036C>G; NM_001792.5: c.2137G>C; p.Asp713His	Missense	0.00006365 (0)	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категория / category: PM1)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 15 Patient № 15	TTN	Chr.2:g.179392218G>A; NM_001267550.2: c.107635C>T; p.Gln35879Ter	Nonsense	0.00001205 (0)	Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2, PP3, PP5)	Хетерозигот (майчин произ- ход) Heterozygous (maternal origin)
	TTN	<u>Chr.2:g.179641163_179641164in sC: NM_001267550.2: c.5427dup; p.Arg1810GlufsTer8</u>	Frameshift	-	Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PVS1, PM2)	Хетерозигот (бащин произход) Heterozygous (paternal origin)
	SCN5A	Chr.3:g.38655290G>A; NM_000335.5: c.647C>T; p.Ser216Leu	Missense	0.0006575 (1)	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM1, PP2, PP3)	Хетерозигот (бащин произход) Heterozygous (paternal origin)
	SCN5A	Chr.3:g.38592121C>A; NM_000335.5: c.5739G>T; p.Arg1913Ser	Missense	-	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM1, PM2, PP2)	Хетерозигот (майчин произ- ход) Heterozygous (maternal origin)
Пациент № 16 Patient № 16	FLNC	Chr.7:g.128470829C>A; NM_001458.5: c.138C>A; p.Cys46Ter	Nonsense	-	Mutation Taster: Disease causing	Вероятно патогенен Likely pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2)	Хетерозигот Heterozygous
	TTN	Chr.2:g.179446909C>G; NM_001267550.2: c.66187G>C; p.Val22063Leu	Missense	0.0000649 (0)	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Tolerated; Mutation Taster: Disease causing	VUS (категории / categories: PM2, BP1)	Хетерозигот Heterozygous
Пациент № 17 Patient № 17	TAZ	Chr.X:g.153648376G>T; NM_000116.5: c.589G>T; p.Gly197Trp	Missense	-	PolyPhen2: Probably damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	Вероятно патогенен Likely pathogenic (категории: / categories PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	Хемизигот (майчин произход) Hemizygous (maternal origin)
Пациент № 18 Patient № 18	NDUFB1	Chr.X:g.47004076C>T. NM_019056.6: c.3G>A; p.Met1Ile	Start loss	-	PolyPhen2: Possibly damaging; SIFT: Damaging; Mutation Taster: Disease causing	Патогенен Pathogenic (категории / categories: PVS1, PM2, PM6)	Хетерозигот (de novo) Heterozygous (de novo)
Пациент № 19 Patient № 19	Не се откриват генетични находки. No genetics findings identified.						
Пациент № 20 Patient № 20	Не се откриват генетични находки. No genetic findings identified.						

Използвани съкращения: ACMG/AMP – Американски колеж по медицинска генетика и геномика/Асоциация по молекулярна патология; VUS – вариант с неясно значение; UCSC – Калифорнийски университет Santa Cruz

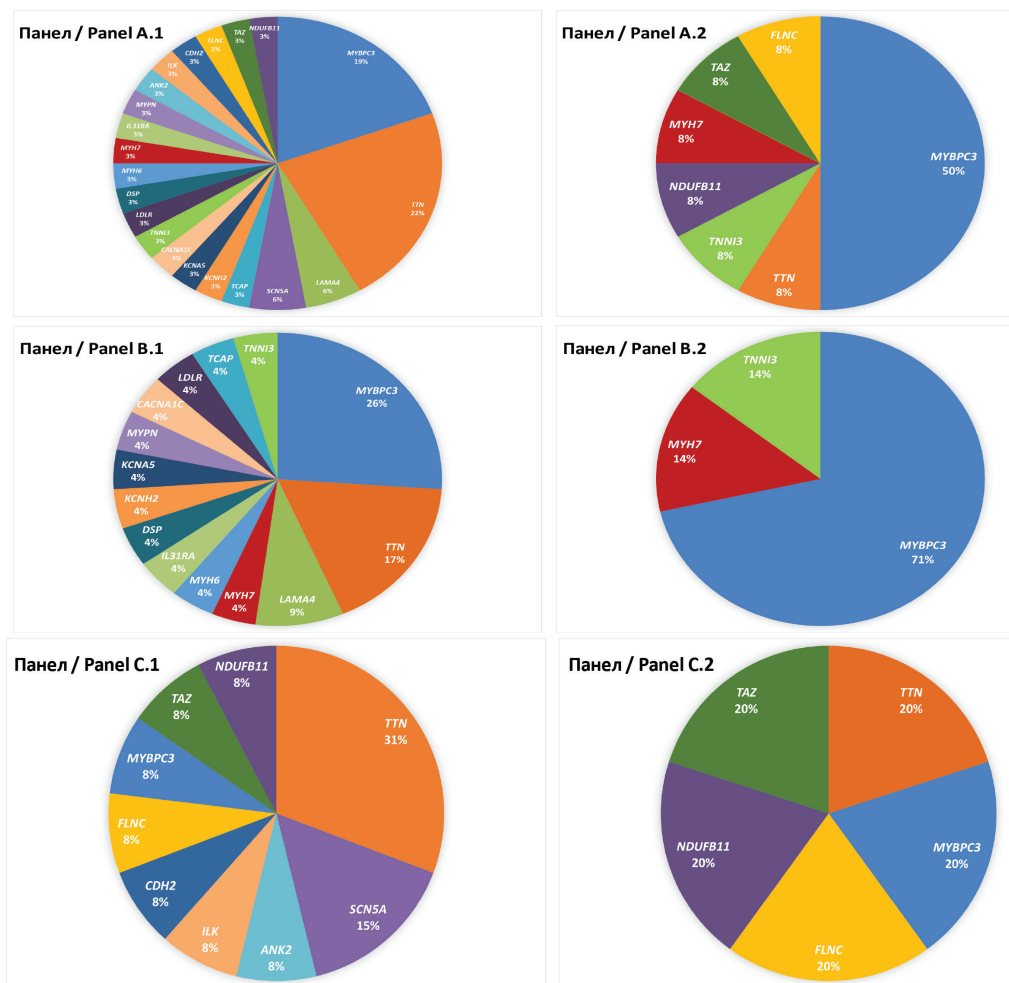
Abbreviations: ACMG/AMP – American College of Medical Genetics and Genomics/ Association for Molecular Pathology; VUS – variant of uncertain significance; UCSC – University of California Santa Cruz

ОБСЪЖДАНЕ

Кардиомиопатиите са клинично и генетично разнообразна група заболявания на сърцето, които представляват важна причина за сърдечна недостатъчност и смъртност [30]. Фенотипът на тези заболя-

DISCUSSION

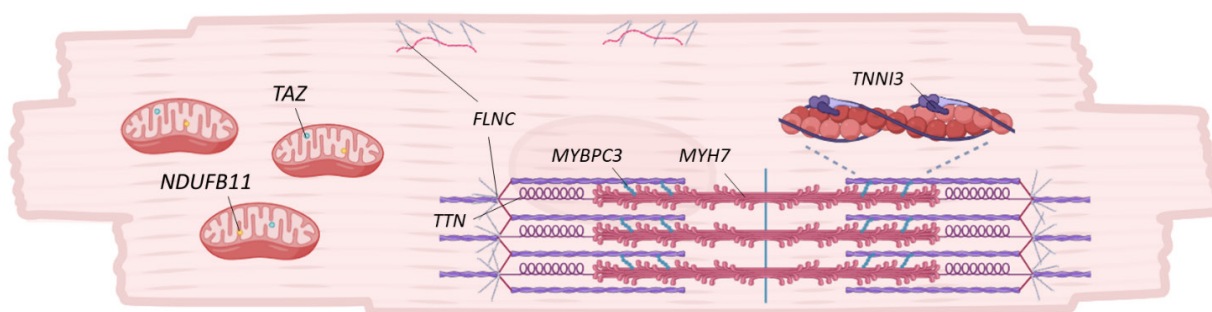
Cardiomyopathies are a clinically and genetically diverse group of diseases of the heart that represent an important cause of heart failure and mortality [30]. The phenotype of these diseases



Фиг. 1. Честота на патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение, както и на патогенни/вероятно патогенни варианти при изследваните пациенти. Резултатите по отношение на честотата на патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение (Панел А.1, Панел В.1 и Панел С.1) и патогенни/вероятно патогенни 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

Fig. 1. Frequency of pathogenic/likely pathogenic variants and variants of uncertain significance, as well as pathogenic/likely pathogenic variants in the studied patients. The results regarding the frequency of pathogenic/likely pathogenic variants and variants of uncertain significance (Panel A.1, Panel B.1 and Panel C.1) and pathogenic/likely pathogenic variants (Panel A.2, Panel B.2 and Panel C.2) in all studied patients are presented in Panel A, in the subgroup of patients with hypertrophic cardiomyopathy in Panel B, and in the subgroup of patients with dilated cardiomyopathy in Panel C

tients. The results regarding the frequency of pathogenic/likely pathogenic variants and variants of uncertain significance (Panel A.1, Panel B.1 and Panel C.1) and pathogenic/likely pathogenic variants (Panel A.2, Panel B.2 and Panel C.2) in all studied patients are presented in Panel A, in the subgroup of patients with hypertrophic cardiomyopathy in Panel B, and in the subgroup of patients with dilated cardiomyopathy in Panel C

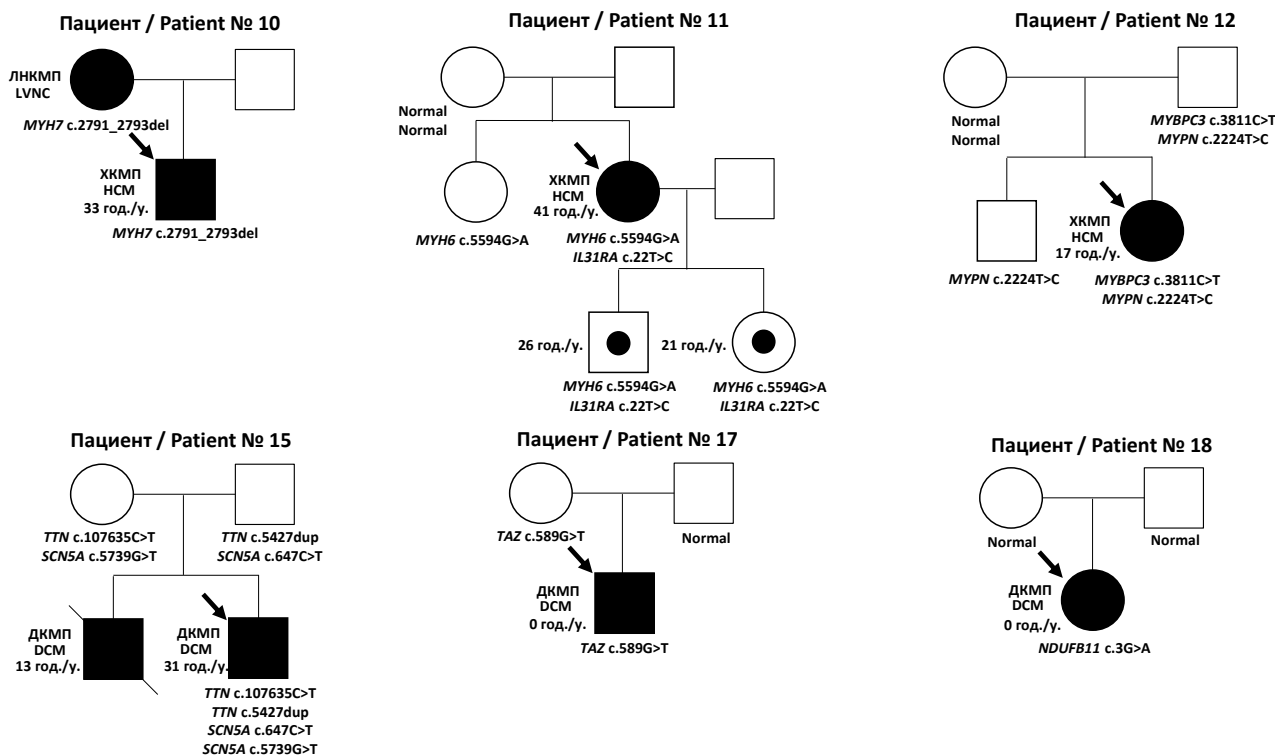


Фиг. 2. Клетъчни компоненти, които са засегнати от мутациите, установени при изследваните пациенти. Патогенни/вероятно патогенни варианти, открити в изследваната пациентска група, засягат саркомерната структура (MYH7, MYBPC3, TNNI3, TTN), митохондриални протеини (TAZ, NDUFB1) и цитоскелета (FLNC)

Fig. 2. Cellular components, affected by the mutations, identified in the studied patients. Pathogenic/probably pathogenic variants, found in the studied patient group, affect sarcomeric structure (MYH7, MYBPC3, TNNI3, TTN), mitochondrial proteins (TAZ, NDUFB1) and cytoskeleton (FLNC)

вания може да се причинява от мутации в приблизително 100 гени, които се характеризират с различни модели на унаследяване, непълна пенетрантност и вариабилна експресия. Характерна особеност при кардиомиопатиите е значителното припокриване на

can be caused by mutations in approximately 100 genes, which are characterized by different inheritance patterns, incomplete penetrance, and variable expression. A characteristic feature of cardiomyopathies is the significant overlap of affected genes,



Използвани съкращения: год. – години; ДКМП – дилатативна кардиомиопатия; ЛНКМП – левокамерна некомпактна кардиомиопатия; ХКМП – хипертрофична кардиомиопатия. // Abbreviations: DCM – dilated cardiomyopathy; LVNC – left ventricular non-compaction cardiomyopathy; HCM – hypertrophic cardiomyopathy; Y. – years

Фиг. 3. Резултати от сегрегационните анализи, проведени при изследваните пациенти. Резултатите от сегрегационните анализи, проведени при пациенти № 10, 11, 12, 15, 17 и 18, изследвани в рамките на проучването, са представени последователно

Fig. 3. Results of the segregation analyses performed in the studied patients. The results of the segregation analyses performed in patients № 10, 11, 12, 15, 17 and 18, studied within the framework of the research, are presented sequentially

засегнатите гени, което е предизвикателство при интерпретацията на резултатите от генетичните изследвания на пациентите. Изясняването на генетичните причини за кардиомиопатиите може да има важно значение за индексните пациенти и техните семейства от клинична гледна точка.

В настоящото проучване при общо 20 пациенти, диагностицирани с кардиомиопатия в България, установената честота на патогенни/вероятно патогенни варианти и варианти с неясно значение е 90%, която е по-висока в сравнение с докладваните в литературата данни, като при ~58% от пациентите с ХКМП и при ~83% от пациентите с ДКМП се откриват патогенни/вероятно патогенни варианти. В проучване, проведено от Alfares и съавт. при 2912 пациенти с ХКМП с приложението на директно секвениране по Sanger на 10 или 11 гена, 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 [31]. Данните от голямо изследване при 4591 пациенти с ХКМП, от които 2763 генотипизирани, показват наличието на патогенни/вероятно патогенни

which presents a challenge in the interpretation of the results of genetic tests of patients. Elucidating the genetic causes of cardiomyopathies may have important clinical implications for index patients and their families.

In the present study, in a total of 20 patients, diagnosed with cardiomyopathy in Bulgaria, the detected frequency of pathogenic/likely pathogenic variants and variants of uncertain significance was 90%, which is higher compared to the data reported in literature, as in ~58% of the patients with HCM and in ~83% of the patients with DCM pathogenic/likely pathogenic variants were found. In a study, conducted by Alfares et al. that included 2912 HCM patients with direct Sanger sequencing of 10 or 11 genes, or next-generation sequencing with a targeted panel of 18, 46, or 51 genes, positive genetic findings were reported in ~32% of patients in the study, and unconfirmed results in an additional ~15% of them [31]. Data from a large study of 4591 HCM patients, of which 2763 were genotyped,

варианти и варианти с неясно значение в саркомерните гени при съответно 46,3% и 9,5% от пациентите [32]. Резултатите от проучване, проведено при 766 пациенти с ДКМП, показват, че положителни генетични находки се установяват при около 37% от изследваните лица, като честотата на непотвърдени случаи (случаи само с VUS) се увеличава от 4.6-6.5% до 51-61% с повишаването на размера на тестовия панел от 5 до 46 гена, което се дължи основно на вариантите, открити в гена за титин, добавен в по-големия панел [33]. Данните от проведено изследване при 151 педиатрични пациенти с кардиомиопатия (66 с ХКМП, 64 с ДКМП, 8 с РКМП и 13 с ЛНКМП) с приложението на таргетен или разширен панел от съответно 47 или 104 гена, показват, че положителни генетични находки са налице при 26% от пациентите, 42% имат открити само варианти с неясно значение, а 32% имат отрицателни резултати [34]. Докладвана е по-висока честота на откритите варианти с неясно значение 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 – цялостно екзомно секвениране и провеждането на молекулярно-генетичен анализ с приложението на разширен панел от 242 гена, свързани с кардиомиопатия, както и приложението на допълнителен таргетен панел от 20 гена, асоциирани с наследствена амилоидоза при двама от пациентите (пациент № 11 и пациент № 14). 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 1/3 от пациентите, включени в настоящото проучване, имат фамилна анамнеза за ВСС или кардиомиопатия – 25% от пациентите с ХКМП и 50% от пациентите с ДКМП. Според данните в литературата, патогенни/вероятно патогенни 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 [26, 27]. За разлика от публикуваните литературни данни, получените резултати при българските пациенти показват, че патогенни/вероятно патогенни варианти се откриват при 55% от пациентите с ХКМП без данни за фамилна анамнеза, при ~67% от пациентите с ХКМП с данни за фамилна анамнеза, както и от пациентите със спорадична ДКМП, а честотата достига 100% при пациентите с ДКМП с положителна фамилна анамнеза. Наличието на 2 или 3 патогенни мутации в един или повече гена при пациенти с ХКМП е докладвано рядко – при съответно 5% и 0.8% от слу-

showed the presence of pathogenic/likely pathogenic variants and variants of uncertain significance in sarcomeric genes in 46.3% and 9.5% of the patients, respectively [32]. The results of a large study, conducted in 766 patients with DCM showed that positive genetic findings were found in about 37% of the patients studied, with the frequency of unconfirmed cases (cases with only VUS) increasing from 4.6-6.5% to 51-61% as the size of the testing panel increased from 5 to 46 genes, which is mainly due to the variants found in the titin gene, included in the larger panel [33]. Data from a study of 151 pediatric patients with cardiomyopathy (66 patients with HCM, 64 patients with DCM, 8 patients with RCM, and 13 patients with LVNC) using a targeted or expanded panel of 47 or 104 genes, showed that positive genetic findings were found in 26% of patients, 42% had only variants of uncertain significance detected, and 32% had negative results [34]. A higher frequency of detected variants of uncertain significance was reported with the use of an extended versus targeted panel (87% vs. 30%, $p < 0.0001$). The high frequency of positive genetic findings in our patient study group can be explained by the chosen method of testing – whole exome sequencing with molecular-genetic analysis of an extended panel of 242 genes, associated with cardiomyopathy, as well as the application of an additional target panel of 20 genes, associated with hereditary amyloidosis in two of the patients (patient #11 and patient #14). Another important prerequisite for the obtained result is the conducted detailed clinical assessment, including family history data, by the treating physicians when determining patients for referral for genetic testing. Approximately 1/3 of the patients included in the present study had a family history of SCD or cardiomyopathy – 25% of patients with HCM and 50% of patients with DCM. According to data in the literature, pathogenic/likely pathogenic variants in patients with HCM are found in ~60% of familial and ~30% of sporadic cases, while in patients with DCM positive genetic findings are reported in 25-40% of patients with a family history of the disease and in 10-30% of those with no family history [26, 27]. In contrast to the published data, the results of the Bulgarian patients show that pathogenic/likely pathogenic variants were found in 55% of patients with HCM with no family history data, in ~67% of HCM patients with family history, as well as in patients with sporadic DCM, and the frequency reaches 100% in DCM patients with a positive family history.

чаите, 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 варианта [35-37]. При нито един пациент в изследваната група не се установяват повече от 1 патогенни/вероятно патогенни генетични варианта, което може да се дължи на малкия брой изследвани пациенти. В съответствие с литературните данни, установените варианти при българските пациенти с кардиомиопатия, са редки варианти, които се откриват при единични пациенти или фамилии [9, 31, 38].

Приблизително 90% от патогенните мутации, които причиняват ХКМП, според литературните данни, са missense мутации [9]. 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 съавт., е докладвано, че ~90% от вариантите, установени при пациенти с фамилна или спорадична ДКМП, са единични нуклеотидни замени (93% missense, 5% nonsense, и 2% splice site варианти), а ~10% от тях са инсерции/делеции с размер от 1 до 4 бази, водещи до изместване на рамката на четене в кодиращите последователности при 86% от случаите [38]. Разпределението по типове варианти в настоящото проучване показва, че се установява съответно 2,5 и 4 пъти по-висока честота на преждевременно терминаращи варианти в сравнение с честотите, докладвани в литературата, както при пациентите с ХКМП (~26%), така и при пациентите с ДКМП (~39%). Въпреки този висок процент, missense мутациите остават водещи, като такива се откриват два пъти по-често и в двете пациентски подгрупи. 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 типа мутация може да има важно клинично значение при определени пациенти с ДКМП по отношение на оценката на риска от аритмии [39]. Преждевременно терминаращи мутации в гена за филамин С с висока пенетрантност са докладвани при семейства с аритмогенна ДКМП и висока честота на ВСС [40, 41]. В голямо проучване при 1150 пациенти с кардиомиопатия (700 ХКМП, 300 ДКМП, 50 РКМП и 100 ЛНКМП), 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. При носителите на преждевременно терминаращи мутации е установена значимо по-висока честота на ВСС или фамилна анамнеза за ВСС спрямо носителите на missense мутации (70% спрямо 19%, $p = 0.01$) [42].

The presence of two or three pathogenic mutations in one or more genes in patients with HCM was rarely reported – in 5% and 0.8% of cases, respectively, while the data from a study of European patients with sporadic or familial DCM, shows that a large proportion of patients were double heterozygotes in one (7%) or in different genes (38%), and that 12.8% of patients carried 3 or more variants [35-37]. None of the patients in the study was found to have more than 1 pathogenic/likely pathogenic genetic variant, which may be due to the small number of patients studied. In accordance with literature data, the variants found in Bulgarian patients with cardiomyopathy represent rare variants that are found in single patients or families [9, 31, 38].

Approximately 90% of the pathogenic mutations that cause HCM, according to literature data, are missense mutations [9]. Insertions/deletions and frameshift mutations have been reported in the *MYBPC3* gene, as well as rare cases of deletions in the *MYH7* and *TNNT2* genes. In a study, conducted by Norton et al., it was reported that ~90% of variants found in patients with familial or sporadic DCM were single nucleotide substitutions (93% missense, 5% nonsense, and 2% splice site variants), and ~10% of them were insertions/deletions with a size of 1 to 4 bases leading to a frameshift in the coding sequences in 86% of cases [38]. The distribution by variant type in the present study shows that a respectively 2,5 and 4-fold higher frequency of truncating variants was found compared to the frequency reports in the literature, both in patients with HCM (~26%), and in patients with DCM (~39%). Despite this high rate, missense mutations remain predominant, being found twice as often in both patient subgroups. While data from a large study of 4,756 HCM patients showed no statistically significant difference in disease phenotype, severity, and adverse events according to the *MYBPC3* gene mutation type, clarification of mutation type may have important clinical implications in certain patients with DCM in terms of assessing the risk of arrhythmias [39]. Truncating mutations in the filamin C gene with a high penetrance have been reported in families with arrhythmogenic DCM and a high incidence of SCD [40, 41]. In a large study of 1150 patients with cardiomyopathy (700 HCM, 300 DCM, 50 RCM and 100 LVNC), truncating mutations in the *FLNC* gene were found only in DCM patients, whereas missense or in-frame insertions/deletions were associated with the other phenotypes. Carriers of truncating mutations had a

При пациентите с ХКМП в нашата група, с най-висока честота се откриват патогенни/вероятно патогенни варианти в *MYBPC3* гена (71%), а ДКМП се характеризира с разнообразен генетичен профил, като данните показват, че *TTN* генът се засяга в 20% от случаите, което най-общо е в съответствие с докладваните литературни данни [10, 11]. Разликите в честотите в сравнение с литературните източници за останалите установени патогенни/вероятно патогенни находки може да се обясни с относително малкия брой изследвани пациенти в двете подгрупи.

Интересно е, че резултатите от проведения сегрегационен анализ в семейството при пациент № 10, диагностициран с ХКМП, потвърждават наличието на варианта c.2791_2793del в *MYH7* гена в хетерозиготно състояние при неговата майка с ЛНКМП.

Важно е да се отбележи, че в подгрупата на пациентите с ДКМП, генетичните находки 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. 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.

В заключение, настоящото проучване предоставя първите обобщени данни по отношение на молекулярногенетичния профил при пациенти с кардиомиопатия в България. Получените резултати от цялостно екзомно секвениране и провеждането на молекулярногенетичен анализ при 20 български пациенти с кардиомиопатия показват наличието на генетични находки при 90% от тях. Патогенни/вероятно патогенни варианти се установяват при повече от половината от пациентите с ХКМП без данни за фамилна анамнеза за ВСС или кардиомиопатия, при ~67% от пациентите с ХКМП с данни за фамилна анамнеза или със спорадична ДКМП, както и при 100% от пациентите с ДКМП с положителна фамилна анамнеза, а генетични находки във връзка с изявената клинична симптоматика не се установяват при пациентите с РКМП в проучването. Изясняването на типа мутация може да има важно клинично значение при определени пациенти с ДКМП по отношение на оценката на риска от аритмии. Патогенни/вероятно патогенни варианти в гена за миозин-свързващия протеин С се откриват с най-висока честота при пациентите с ХКМП, докато ДКМП се свързва с генетични находки в различни гени. Генетичните варианти, установени в *NDUFB11* и *TAZ* гените, се свързват с тежка клинична изява в първите дни на постнаталния период. Резултати от проведени сегрегационни анализи чрез директно секве-

significantly higher incidence of SCD or a family history of SCD than carriers of missense mutations (70% vs. 19%, $p = 0.01$) [42].

Pathogenic/likely pathogenic variants in the *MYBPC3* gene (71%) were found in our HCM patients with the highest frequency, and DCM is characterized by a diverse genetic profile, with the data showing that the *TTN* gene being affected in 20% of cases, which is generally in agreement with reported literature data [10, 11]. The differences in frequencies compared to literature sources for other detected pathogenic/likely pathogenic findings may be explained by the relatively small number of patients studied in both of our subgroups.

Interestingly, the results of family segregation analysis in patient #10, diagnosed with HCM confirmed the presence of the variant c.2791_2793del in the *MYH7* gene in a heterozygous state in his mother with LVNC.

It is important to note that in the subgroup of DCM patients, genetic findings in *NDUFB11* and *TAZ* genes, encoding proteins with a specific role in mitochondrial metabolism, were associated with severe clinical presentation in pediatric patients in the first days of the postnatal period. In this regard, genetic testing and elucidating of the genetic diagnosis in these patients may be of key importance in determining the course and prognosis of the disease, clinical management and therapeutic strategy, as well as the risk of inheritance in the family.

In conclusion, the current study provides the first pooled data regarding the molecular-genetic profile of cardiomyopathy patients in Bulgaria. The results obtained from whole exome sequencing and the performed molecular-genetic analysis in 20 Bulgarian patients with cardiomyopathy show the presence of genetic findings in 90% of them. Pathogenic/likely pathogenic variants were found in more than half of patients with HCM with no family history of SCD or cardiomyopathy, in ~67% of patients with HCM with family history or with sporadic DCM, as well as in 100% of DCM patients with a positive family history, and genetic findings related to the manifested clinical symptoms were not identified in the patients with RCM in the study. Clarification of the type of mutation may have important clinical implications in certain patients with DCM in terms of assessing the risk of arrhythmias. Pathogenic/likely pathogenic variants in the myosin-binding protein C gene were found with the highest frequency in patients with HCM, while DCM is associated with genetic findings in different genes. The genetic variants, found in the *NDUFB11* and *TAZ* genes, were associated with severe clinical presentation in the early days of the postnatal period. Results of segregation

ниране по Sanger са докладвани в 6 от засегнатите семейства. **Основно ограничение** на изследването представлява малкия брой включени и анализирани пациенти. Данните от проведеното проучване са в подкрепа на приложението на генетични изследвания и медико-генетично консултиране при пациентите и засегнатите семейства с кардиомиопатия в България.

Благодарности: Изразяваме благодарност за финансовата подкрепа на Медицински университет – София, Грант № Д-325/2022.

Не е деклариран конфликт на интереси

Библиография/References

1. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006 Apr 11;113(14):1807-16. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287.
2. Czepluch FS, Wollnik B, Hasenfuß G. Genetic determinants of heart failure: facts and numbers. *ESC Heart Fail*. 2018 Jun;5(3):211-217. doi:10.1002/ehf2.12267.
3. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, et al. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*. 1995 Aug 15;92(4):785-9. doi:10.1161/01.cir.92.4.785.
4. Semsarian C, Ingles J, Maron MS, et al. New perspectives on the prevalence of hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Mar 31;65(12):1249-1254. doi:10.1016/j.jacc.2015.01.019.
5. Maron BJ. Clinical Course and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2018 Aug 16;379(7):655-668. doi:10.1056/NEJMra1710575.
6. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies. *Eur Heart J*. 2023 Oct 1;44(37):3503-3626. doi:10.1093/eurheartj/ehad194.
7. Ingles J, Burns C, Bagnall RD, et al. Nonfamilial hypertrophic cardiomyopathy: prevalence, natural history, and clinical implications. *Circ Cardiovasc Genet*. 2017;10:e001620. doi:10.1161/CIRCGENETICS.116.001620.
8. Geske JB, Ommen SR, Gresh BJ. Hypertrophic Cardiomyopathy: Clinical Update. *JACC Heart Fail*. 2018 May;6(5):364-375. doi:10.1016/j.jchf.2018.02.010.
9. Marian AJ and Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*. 2017 September 15; 121(7): 749–770. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311059.
10. Akhtar M and Elliott P. The genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2018 Aug 12;2018(3):36. doi:10.21542/gcsp.2018.36.
11. Hershberger RE, Hedges DJ, Morales A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol*. 2013 Sep;10(9):531-47. doi:10.1038/nrcardio.2013.105.
12. Hershberger RE, Morales A, Siegfried JD. Clinical and genetic issues in dilated cardiomyopathy: a review for genetics professionals. *Genet Med*. 2010 Nov;12(11):655-67. doi:10.1097/GIM.0b013e3181f2481f.

analyses performed by direct Sanger sequencing were reported in 6 of the affected families. **A major limitation** of the study is the small number of included and analyzed patients. The data from the study supports the importance of conducted genetic testing and medical-genetic counseling in patients and affected families with cardiomyopathy in Bulgaria.

Acknowledgments: The financial support of Medical University – Sofia, Grant № D-325/2022 is gratefully acknowledged.

No conflict of interest was declared

13. Hershberger RE, Siegfried JD. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Apr 19;57(16):1641-9. doi:10.1016/j.jacc.2011.01.015.
14. Mestroni L, Brun F, Spezzacatene A, et al. Genetic causes of dilated cardiomyopathy. *Prog Pediatr Cardiol*. 2014 Dec;37(1-2):13-18. doi:10.1016/j.ppedcard.2014.10.003.
15. Herman DS, Lam L, Taylor MR, et al. Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2012 Feb 16;366(7):619-28. doi:10.1056/NEJMoa1110186.
16. Weintraub RG, Semsarian C, Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet*. 2017 Jul 22;390(10092):400-414. doi:10.1016/S0140-6736(16)31713-5.
17. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies: this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Europace*. 2011 Aug;13(8):1077-109. doi:10.1016/j.hrthm.2011.05.020.
18. Wilcox JE and Hershberger RE. Genetic cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*. 2018 May;33(3):354-362. doi:10.1097/HCO.0000000000000512.
19. Wilde AAM, Semsarian C, Márquez MF, et al. 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. *Europace*. 2022 Apr 4;euac030. doi:10.1016/j.hrthm.2022.03.1225.
20. James CA, Syrris P, van Tintelen JP, et al. The role of genetics in cardiovascular disease: arrhythmogenic cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2020 Apr 7;41(14):1393-1400. doi:10.1093/eurheartj/ehaa141.
21. Captur G and Nihoyannopoulos P. Left ventricular non-compaction: genetic heterogeneity, diagnosis and clinical course. *Int J Cardiol*. 2010 Apr 15;140(2):145-53. doi:10.1016/j.ijcard.2009.07.003.
22. Van Waning JI, Caliskan K, Hoedemaekers YM, et al. Genetics, Clinical Features, and Long-Term Outcome of Noncompaction Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2018 Feb 20;71(7):711-722. doi:10.1016/j.jacc.2017.12.019.
23. Bleyl SB, Mumford BR, Brown-Harrison MC, et al. Xq28-linked noncompaction of the left ventricular myocardium: prenatal diagnosis and pathologic analysis of affected individuals. *Am J Med Genet*. 1997 Oct 31;72(3):257-65. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-8628(19971031)72:3<257::AID-AJMG2>3.0.CO;2-O
24. McKenna WJ and Judge DP. Epidemiology of the inherited cardiomyopathies. *Nat Rev Cardiol*. 2021 Jan;18(1):22-36. doi:10.1038/s41569-020-0428-2.
25. Elliott PM, Anastakis A, Borger MA, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy:

the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014 Oct 14;35(39):2733-79. doi:10.1093/eurheartj/ehu284.

26. Ommen SR, Mital S, Burke MA, et al. 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*. 2020 Dec 22;76(25):e159-e240. doi:10.1016/j.jacc.2020.08.045.

27. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, et al. 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*. 2022 May 3;79(17):e263-e421. doi:10.1016/j.jacc.2021.12.012.

28. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2021 Sep 21;42(36):3599-3726. doi:10.1093/eurheartj/ehab368.

29. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24. doi:10.1038/gim.2015.30.

30. Braunwald E. Cardiomyopathies: An Overview. *Circ Res*. 2017 Sep 15;121(7):711-721. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311812.

31. Alfares AA, Kelly MA, McDermott G, et al. Results of clinical genetic testing of 2,912 probands with hypertrophic cardiomyopathy: Expanded panels offer limited additional sensitivity. *Genet Med*. 2015 Nov;17(11):880-8. doi:10.1038/gim.2014.205.

32. Ho CY, Day SM, Ashley EA, et al. Genotype and Lifetime Burden of Disease in Hypertrophic Cardiomyopathy: Insights from the Sarcomeric Human Cardiomyopathy Registry (SHaRe). *Circulation*. 2018 Oct 2;138(14):1387-1398. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.033200.

33. Pugh TJ, Kelly MA, Gowrisankar S, et al. The landscape of genetic variation in dilated cardiomyopathy as surveyed by clinical

DNA sequencing *Genet Med*. 2014 Aug;16(8):601-8. doi:10.1038/gim.2013.204.

34. Ouellette AC, Mathew J, Manickaraj AK, et al. Clinical genetic testing in pediatric cardiomyopathy: Is bigger better? *Clin Genet*. 2018 Jan;93(1):33-40. doi:10.1111/cge.13024.

35. Ingles J, Doolan A, Chiu C, et al. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling *J Med Genet* 2005;42:e59. doi: 10.1136/jmg.2005.033886.

36. Girolami F, Ho CY, Semsarian C, et al. Clinical features and outcome of hypertrophic cardiomyopathy associated with triple sarcomere protein gene mutations. *J Am Coll Cardiol*. 2010 Apr 6;55(14):1444-53. doi: 10.1016/j.jacc.2009.11.062.

37. Haas J, Frese KS, Peil B, et al. Atlas of the clinical genetics of human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J*. 2015 May 7;36(18):1123-35a. doi:10.1093/eurheartj/ehu301.

38. Norton N, Robertson PD, Rieder MJ, et al. Evaluating pathogenicity of rare variants from dilated cardiomyopathy in the exome era. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012 Apr 1;5(2):167-74. doi:10.1161/CIRCGENETICS.111.961805.

39. Helms AS, Thompson AD, Glazier AA, et al. Spatial and Functional Distribution of MYBPC3 Pathogenic Variants and Clinical Outcomes in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Genom Precis Med*. 2020 Oct;13(5):396-405. doi: 10.1161/CIRCGEN.120.002929.

40. Begay RL, Tharp CA, Martin A, et al. FLNC Gene Splice Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2016 Aug;1(5):344-359.

41. Begay RL, Graw SL, Sinagra G, et al. Filamin C Truncation Mutations Are Associated With Arrhythmogenic Dilated Cardiomyopathy and Changes in the Cell-Cell Adhesion Structures. *JACC Clin Electrophysiol*. 2018 Apr;4(4):504-514.

42. Ader F, De Groote P, Réant P, et al. FLNC pathogenic variants in patients with cardiomyopathies: Prevalence and genotype-phenotype correlations. *Clin Genet*. 2019 Oct;96(4):317-329. doi: 10.1111/cge.13594.