

UNIVERSITY HOSPITAL BRNO
FACULTY OF MEDICINE
MASARYK UNIVERSITY



DEPARTMENT OF **PAEDIATRIC**
ANAESTHESIOLOGY
AND INTENSIVE CARE MEDICINE

Jak pomáhá genetika, zajímavé rodokmeny

Martina Klincová

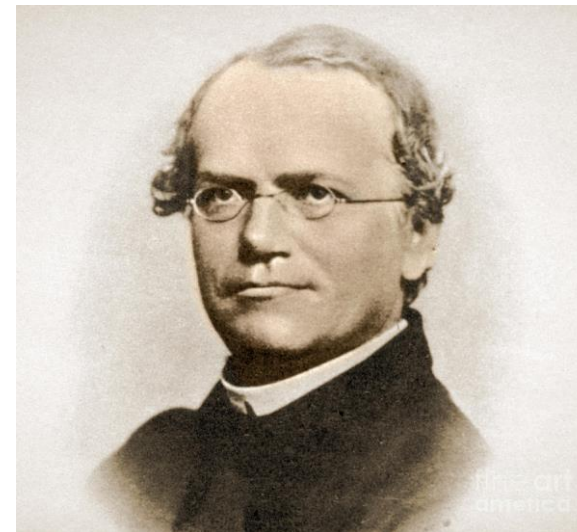
 **FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO**

**M U N I
M E D**



sekce mladých
anesteziologů
a intenzivistů

Proč by nás měla genetika vůbec zajímat?



MH je život ohrožující anesteziologická komplikace

MH je AD dědičná...



Diagnostické centrum pro MH v Brně

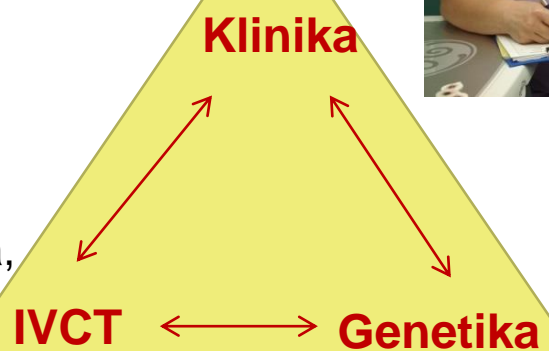
Klinika dětské anesteziologie
a resuscitace
FN Brno



Anesteticko resuscitační klinika,
FN u Sv. Anny Brno



Od 2002



Oddělení klinické genetiky,
FN Brno



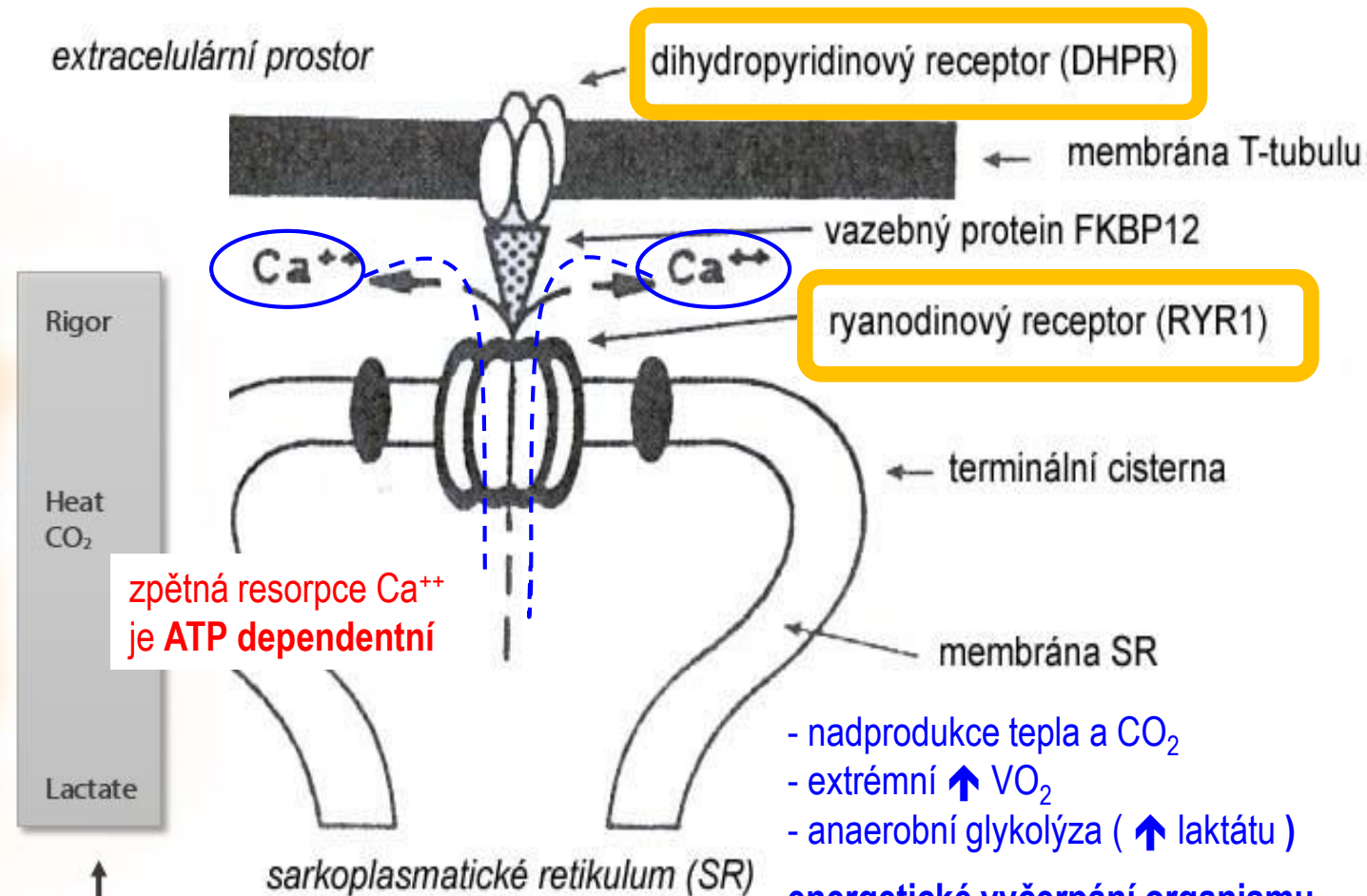
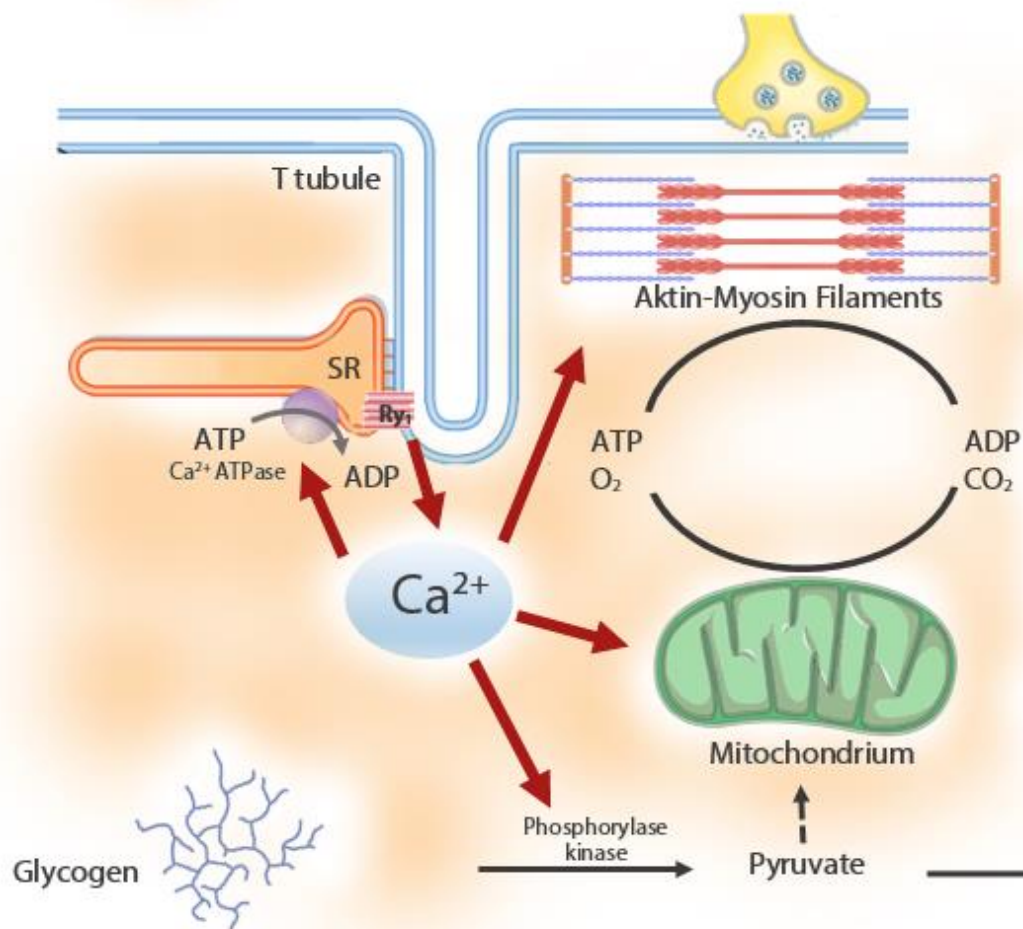
Od 2003



Patofyziologie MH

ECC = Excitation-Contraction Coupling.

Spojení excitace-kontrakce je fyziologický proces přeměny elektrického podnětu na mechanickou odezvu. Je to spojení (transdukce) mezi akčním potenciálem generovaným v sarkolemu a začátkem svalové kontrakce.

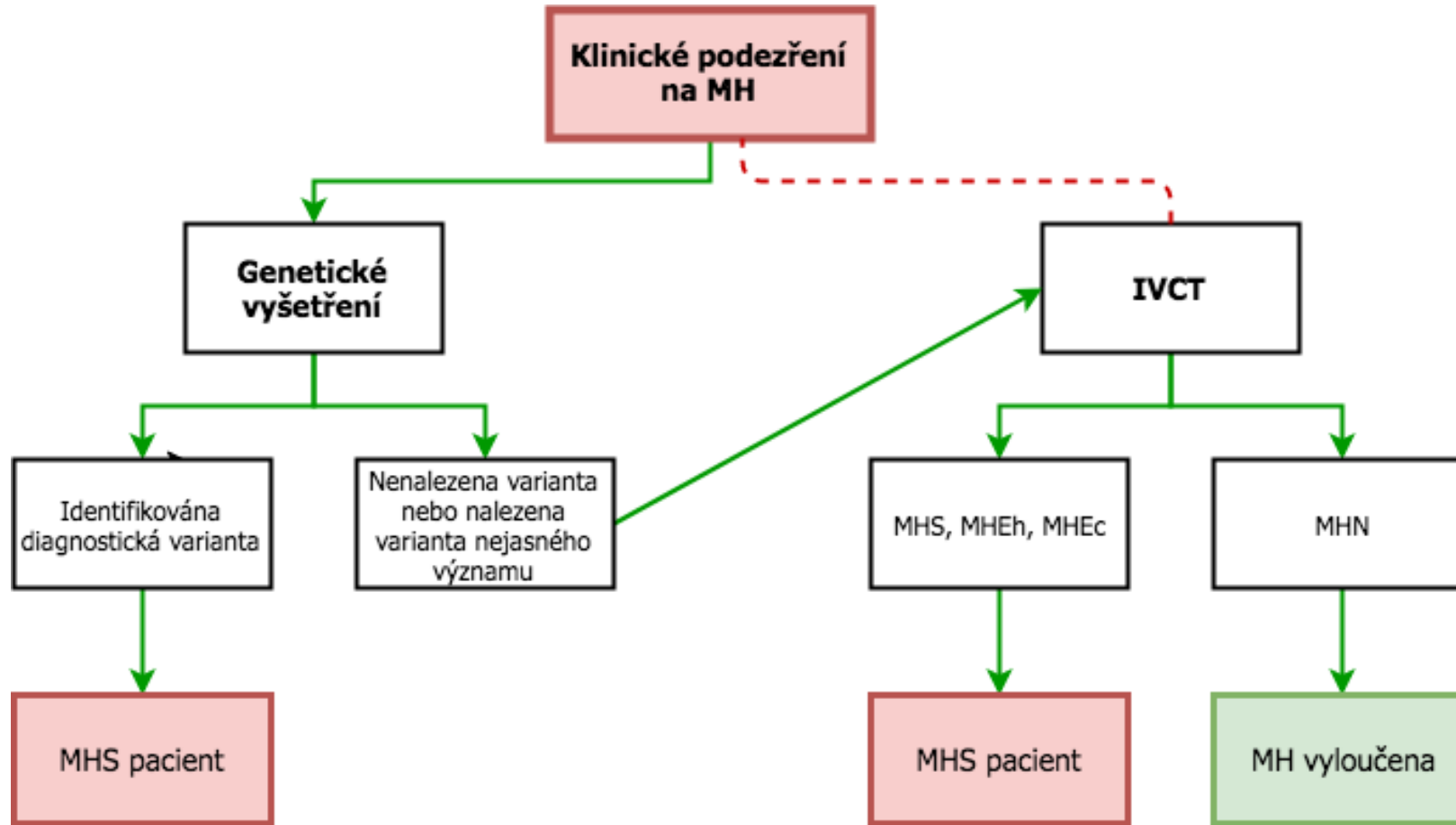


zpětná resorpce Ca⁺⁺ je ATP dependentní

- nadprodukce tepla a CO₂
 - extrémní ↑ VO₂
 - anaerobní glykolýza (↑ laktátu)
- energetické vyčerpání organismu
smíšená acidóza**



Diagnostický algoritmus



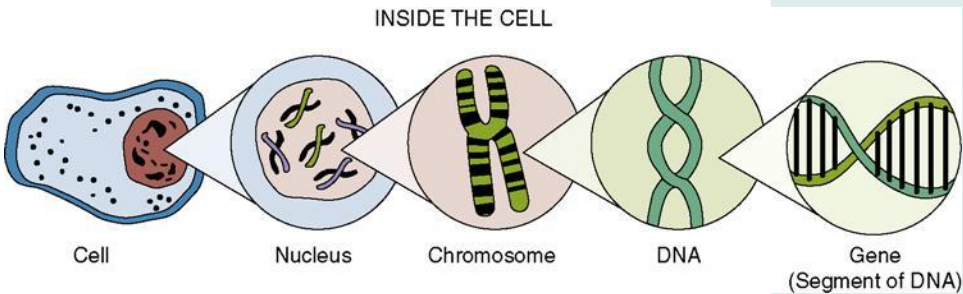
Jak se MH pacient na genetiku dostane?

1. **Susp. MH epizoda** – lékař, který ji diagnostikoval anebo léčil nahlásí pacienta do Diagnostického centra MH v Brně a dodá veškerou dokumentaci + vyplněný *Dotazník k DNA Analýze RYR1 genu*
2. Diagnostické MH centrum doporučí správný a individuálně upravený diagnostický postup
3. Při odůvodněném podezření je indikované genetické vyšetření
4. **Pacient má 2 možnosti**
 - Může se dostavit přímo na **Oddělení lékařské genetiky FN Brno**, kde je genetické diagnostické centrum pro MH. Další informace a termíny konzultace pro pacienty domluvíte na tel. č. 532 234 490.
 - Může se dostavit na **pracoviště lékařské genetiky v místě bydliště**. Seznam pracovišť lékařské genetiky k nalezení zde: <https://new.slg.cz/pracoviste/kg/>
5. **Žádanka není nutná**, postačuje lékařská zpráva z pracoviště, které susp. MH stanovilo a mail z Centra MH, kde byla potvrzena indikace k vyšetření.
6. **Klinický genetik** vyplní s pacientem indikační dotazník, informovaný souhlas pacienta a příslušnou žádanku k molekulárně genetickému vyšetření, zajistí odběr krve a odešle materiál k DNA analýze do laboratoře OLG FN Brno. *Adresa: Oddělení lékařské genetiky FN Brno – PDM, Černopolní 9, 613 00 Brno*
7. Výše uvedené dokumenty: **Dotazník k DNA Analýze RYR1 genu**, **Žádanka k molekulárně genetickému vyšetření** a **Informovaný souhlas pacienta** jsou k dispozici volně ke stažení na <https://www.fnbrno.cz/detska-nemocnice/oddeleni-lekarske-genetiky/dokumenty-ke-stazeni/t4146>



Kde a co hledáme?

Gene defects affecting ^{the} ECC cycle



Gene	Locus		Protein	Diagnóza
RYR 1	19q13.1	AD, AR	Skeletal muscle ryanodin receptor	Central Core Disease (CCD) Multi-minicore Disease (MmD) Centronuclear Myopathy (CNM) Congenital Fibre Type Dysproportion (CFTD) Malignant Hypertermia (MH) MH-associated myopathies Periodic Paralysis (PP)
CACNA1S	1q32.1	AD, AR	L-type Ca channel alpha 1S subunit	Periodic Paralysis (PP) Congenital Myopathy
STAC3	12q13.3	AR	SH3 And Cysteine-Rich Domain Containing Protein	Native American Myopathy (NAM)
TRDN	6q22.31	AR	Triadin	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia Congenital Myopathy
ATP2A1	16p11.2	AR	Fast-twitch SR Ca ATPase	Brody myopathy



Aktuální seznam diagnostických mutací dle European Malignant Hyperthermia Group (EMHG)

Mutations in RYR1

#	Exon	Nucleotide	Aminoacid
1	2	c.103T>C	p.Cys35Arg
2	2	c.130C>T	p.Arg44Cys
3	6	c.487C>T	p.Arg163Cys
4	6	c.488G>T	p.Arg163Leu
5	9	c.742G>C	p.Gly248Arg
6	9	c.742G>A	p.Gly248Arg
7	11	c.982C>T	p.Arg328Trp
8	11	c.1021G>A	p.Gly341Arg
9	11	c.1021G>C	p.Gly341Arg
10	12	c.1201C>T	p.Arg401Cys
11	12	c.1209C>G	p.Ile403Met
12	14	c.1565A>C	p.Tyr522Ser
13	15	c.1589G>A	p.Arg530His
14	15	c.1597C>T	p.Arg533Cys
15	15	c.1598G>A	p.Arg533His
16	15	c.1654C>T	p.Arg552Trp
17	17	c.1840C>T	p.Arg614Cys
18	17	c.1841G>T	p.Arg614Leu
19	39	c.6487C>T	p.Arg2163Cys
20	39	c.6488G>A	p.Arg2163His
21	39	c.6502G>A	p.Val2168Met
22	40	c.6617C>G	p.Thr2206Arg

23	40
24	43
25	44
26	44
27	44
28	44
29	45
30	45
31	45
32	46
33	46
34	46
35	46
36	46
37	47
38	47
39	47
40	63
41	87
42	100
43	100
44	100
45	101
46	101
47	101
48	102

c.6617C>T
c.7007G>A
c.7042_7044del
c.7048G>A
c.7063C>T
c.7124G>C
c.7282G>A
c.7300G>A
c.7304G>A
c.7354C>T
c.7360C>T
c.7361G>A
c.7372C>T
c.7373G>A
c.7522C>T
c.7522C>G
c.7523G>A
c.9310G>A
c.11969G>T
c.14387A>G
c.14477C>T
c.14497C>T
c.14512C>G
c.14545G>A
c.14582G>A
c.14693T>C

p.Thr2206Met
p.Arg2336His
p.Glu2348del
p.Ala2350Thr
p.Arg2355Trp
p.Gly2375Ala
p.Ala2428Thr
p.Gly2434Arg
p.Arg2435His
p.Arg2452Trp
p.Arg2454Cys
p.Arg2454His
p.Arg2458Cys
p.Arg2458His
p.Arg2508Cys
p.Arg2508Gly
p.Arg2508His
p.Glu3104Lys
p.Gly3990Val
p.Tyr4796Cys
p.Thr4826Ile
p.His4833Tyr
p.Leu4838Val
p.Val4849Ile
p.Arg4861His
p.Ile4898Thr

Mutations in CACNA1S

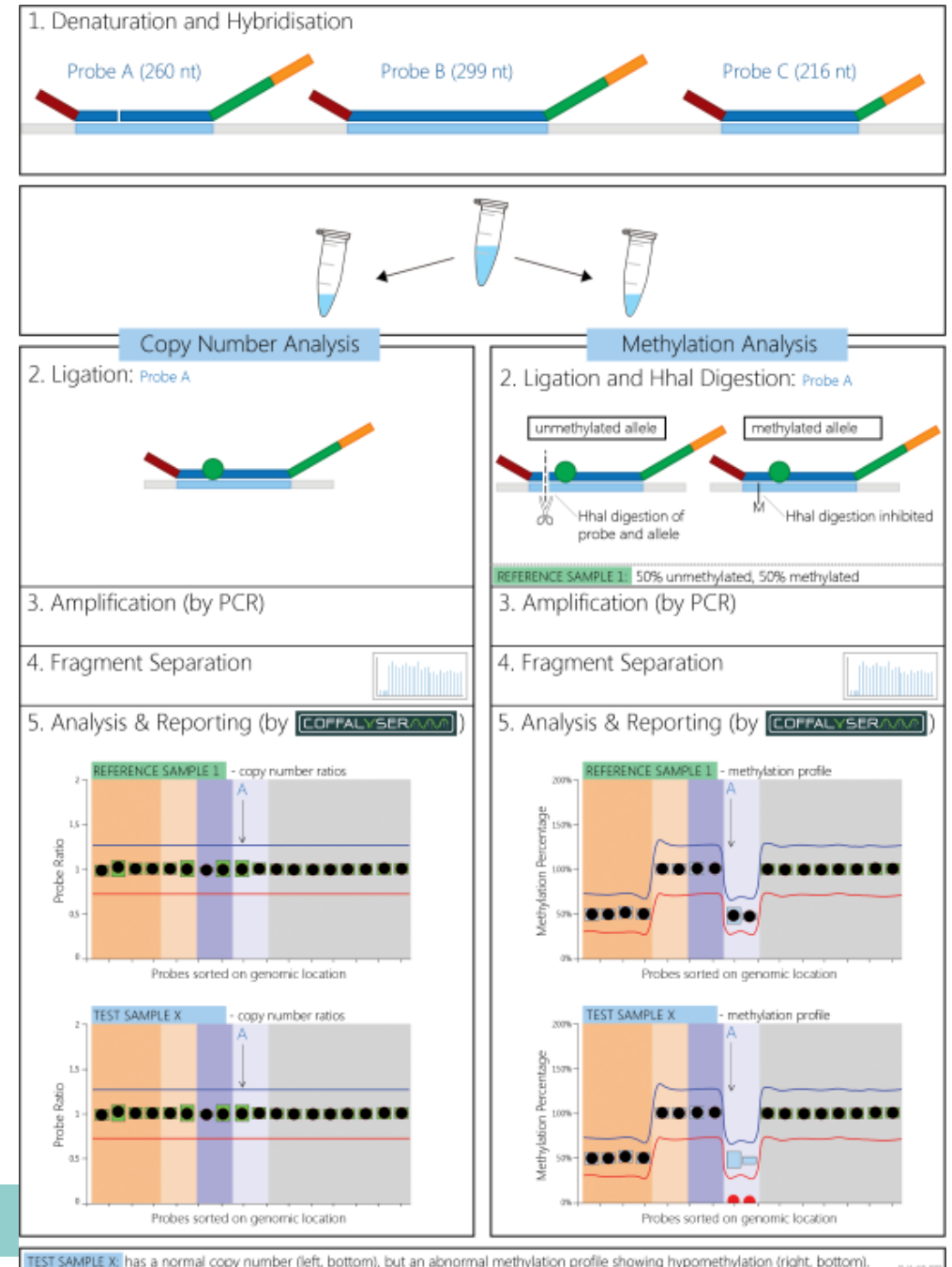
- p.Arg1086His c.3257G>A
- p.Arg174Trp c.520C>T

Celkem toho času 48 diagnostických mutací na RYR1 a 2 na CACNA1S



Jaké máme možnosti genetické diagnostiky?

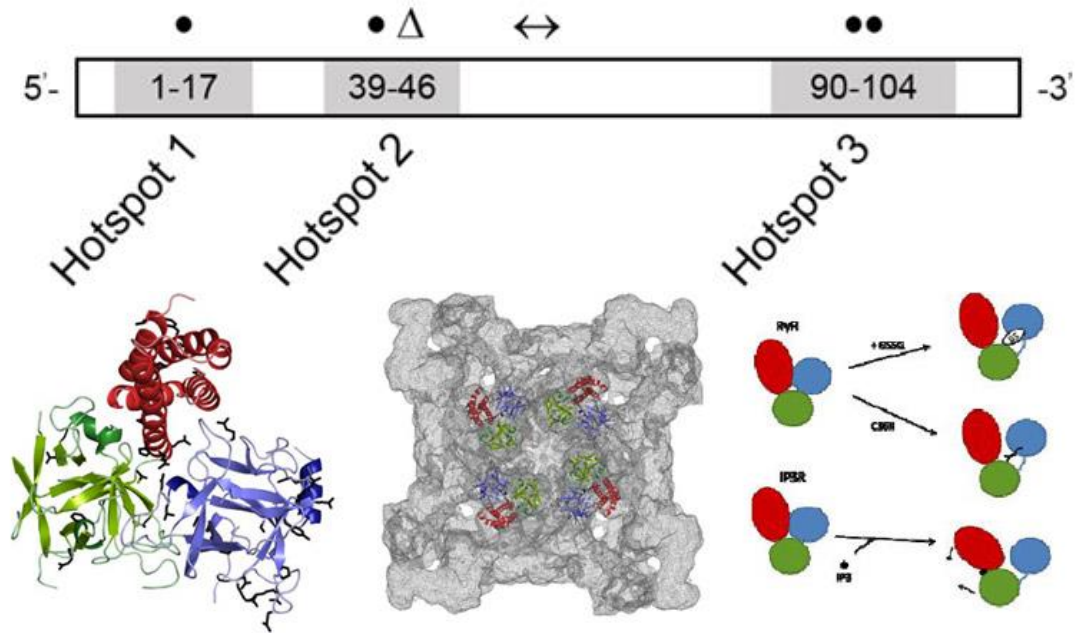
- **MLPA - 1. diagnostický krok**
- **MLPA® (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)** je multiplexní metoda PCR detekující abnormální počet kopií až 50 různých genomických DNA nebo RNA sekvencí, který je schopen rozlišit sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu.
- Firemně dodávaný přichystaný MH panel pro **31 mutací**.
- + relativně rychle a lehce
- omezený záchyt mutací



Jaké máme možnosti genetické diagnostiky?

• Hot spots sekvenace – 2. diagnostický krok

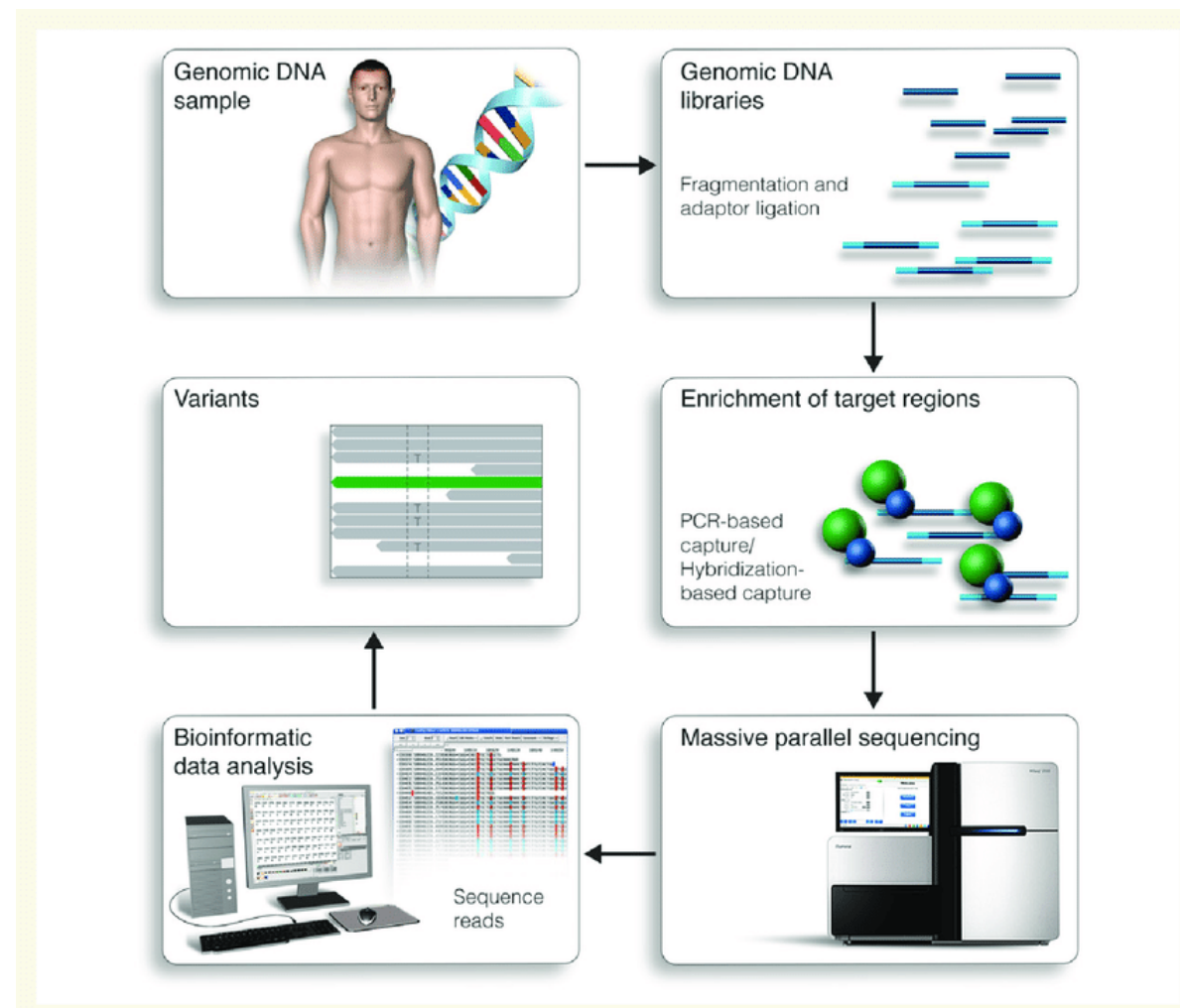
- Rekombinační hotspoty jsou **oblasti v genomu, které vykazují zvýšenou míru rekombinace** vzhledem k neutrálnímu očekávání. Míra rekombinací v hotspotech může být stokrát vyšší než v okolní oblasti.
 - Na RYR1 testujeme 22 exonů
 - Na CACNA1S testujeme 2 exony
- + relativně lehce, relativně finančně dostupně a dobrý záchyt
- nezachytí vzácné mutace mimo zkoumané regiony



Jaké máme možnosti genetické diagnostiky?

• NGS (NextGenSeq)

- **Sekvenování nové generace** je nová metoda pro sekvenování genomů při vysoké rychlosti a nízkých nákladech. Je také známá jako sekvenování druhé generace (SGS) nebo masivně paralelní sekvenování (MPS).
 - Jednotlivé geny nebo celogenomové, **včetně intronů**
 - Odhalí spoustu variant nejasného významu včetně polymorfizmů
 - Musí se interpretovat pomocí tzv. In silico analýz + největší záchyt
 - cena, obtížná interpretace a časová nákladnost
- ? Jaké je jeho místo v genetickém diagnostickém algoritmu?



Jak dlouho to trvá? A jaké výsledky lze očekávat?

- MLPA + Hot spots – cca 3 – 4 měsíce
- NGS – cca 6 měsíců
- **Při detekci konkrétní diagnostické mutace lze MH na základě genetického nálezu potvrdit = GENETICKÁ Dg. MH**
- Když vím, jakou konkrétní mutaci v rodině hledám, tak se dělá tzv. **Scoring**, který trvá cca 1 měsíc
- **Na základě negativního genetického vyšetření nelze MH vyloučit** – nezpochybnitelný význam IVCT.
- Poměrně široká šedá zóna, kdy často nalzáme varianty potencionálně patogenní, nejasné patogenity, pravděpodobně benigní nebo polymorfizmy...
- Existují přesně daná kritéria pro mutace <https://www.emhg.org/genetic-scoring-matrix>



Diagnostika MH v ČR v číslech

Počet hlášení v souvislosti s MH celkem 269

IVCT celkem 225: 57 MHS, 10 MHEc, 37 MHEh, 121 MHN

152 MH rodin celkem

68 Pozitivních rodin

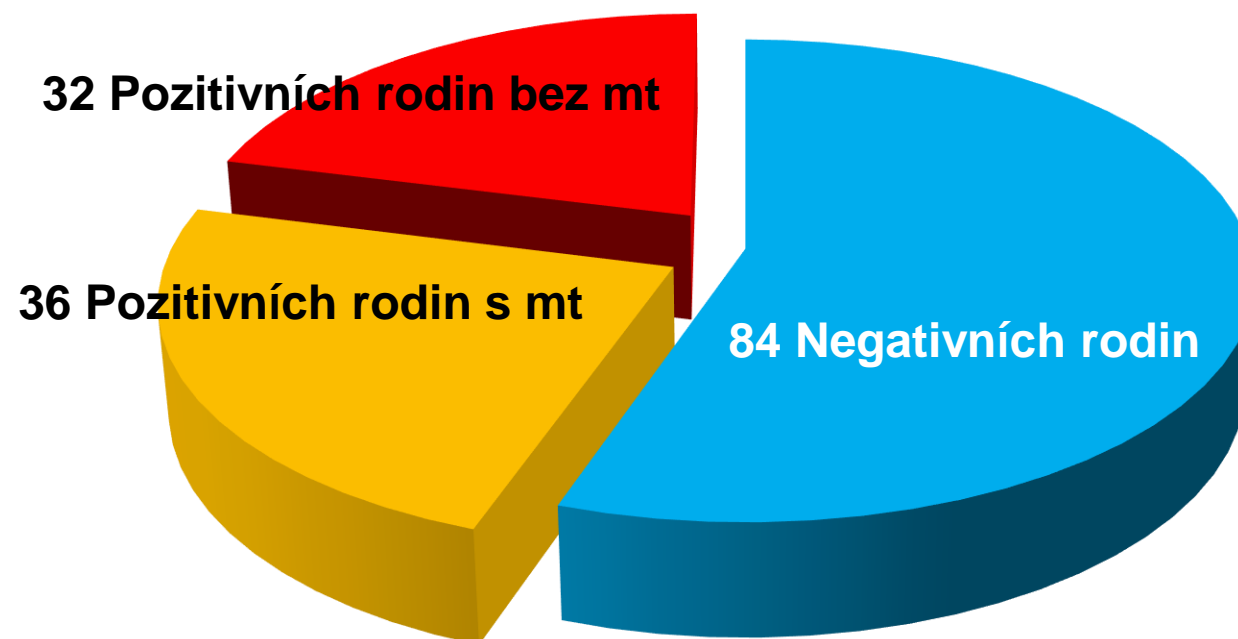
84 Negativních rodin

53 % geneticky informativních

(ve světě dle literatury cca 60-70 %)

V české populaci prokázáno:

12 diagnostických variant RYR1 z celkem 48 na RYR1, 0 diagnostických na CACNA1S



MH Kazuistika 1

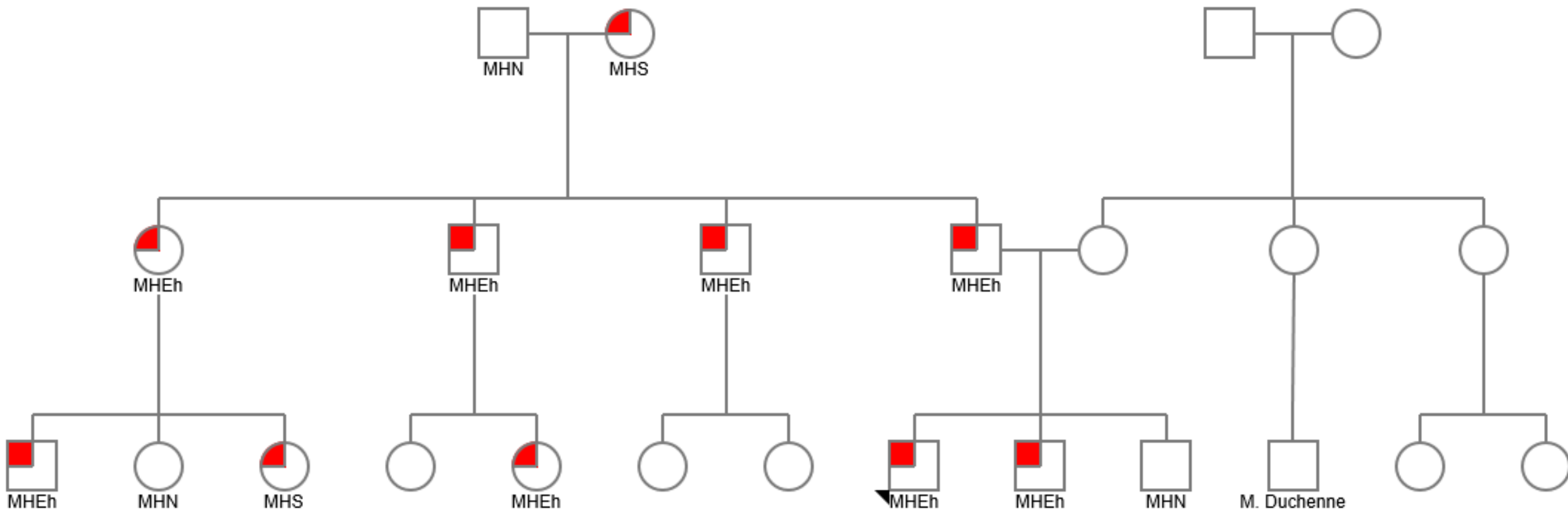
- RA: matka měla 3x CA - bez komplikací, OA: v 9/97 prodělal operaci cysty na krku - bez komplikací.
- !!! U bratrance dítěte je potvrzena progresivní svalová dystrofie - M. Duchenne !!!
- OA: Po úvodu do anestezie (Halotan+ SCCHJ) **bigeminie bez reakce na léčbu**, anestezie ukončena, ventilace 100%O₂, **arytmie trvá téměř 90 min**, přetrvává farmakologický útlum, dlouho se obnovuje spontánní dechová aktivita. TT 37,0 °C během anestezie, **po CA 38,2 °C v m.m.** Po obnovení spontánní ventilace dítě soporósní, předáno na ARO. Zde nutná péče o volné dýchací cesty (vzduchovod, Esmarchův hmat), distanční inspirační stridor. **Aplikován Dantrolen** bolus a dále kontinuálně, Solu-Medrol, Heparin, AT III.
- Tachykardie 162/min, TK 120/70, SpO₂ 96% při oxygenoterapii. Pozitivní volný myoglobin v séru, v moči neprokázán. Slovně uvedena výrazná respirační acidósa, hyperkapnie, konkrétní hodnoty neuvedeny.
- **Dětský pacient – IVCT podstoupili rodiče** / 2004 – genetická diagnostika ještě omezeně /



MH Kazuistika 1

08/2019 NGS

Nalezena CACNA1S mut – c.4601G>A, p.R1534Q
potencionálně patogenní, zatím není na seznamu EMHG

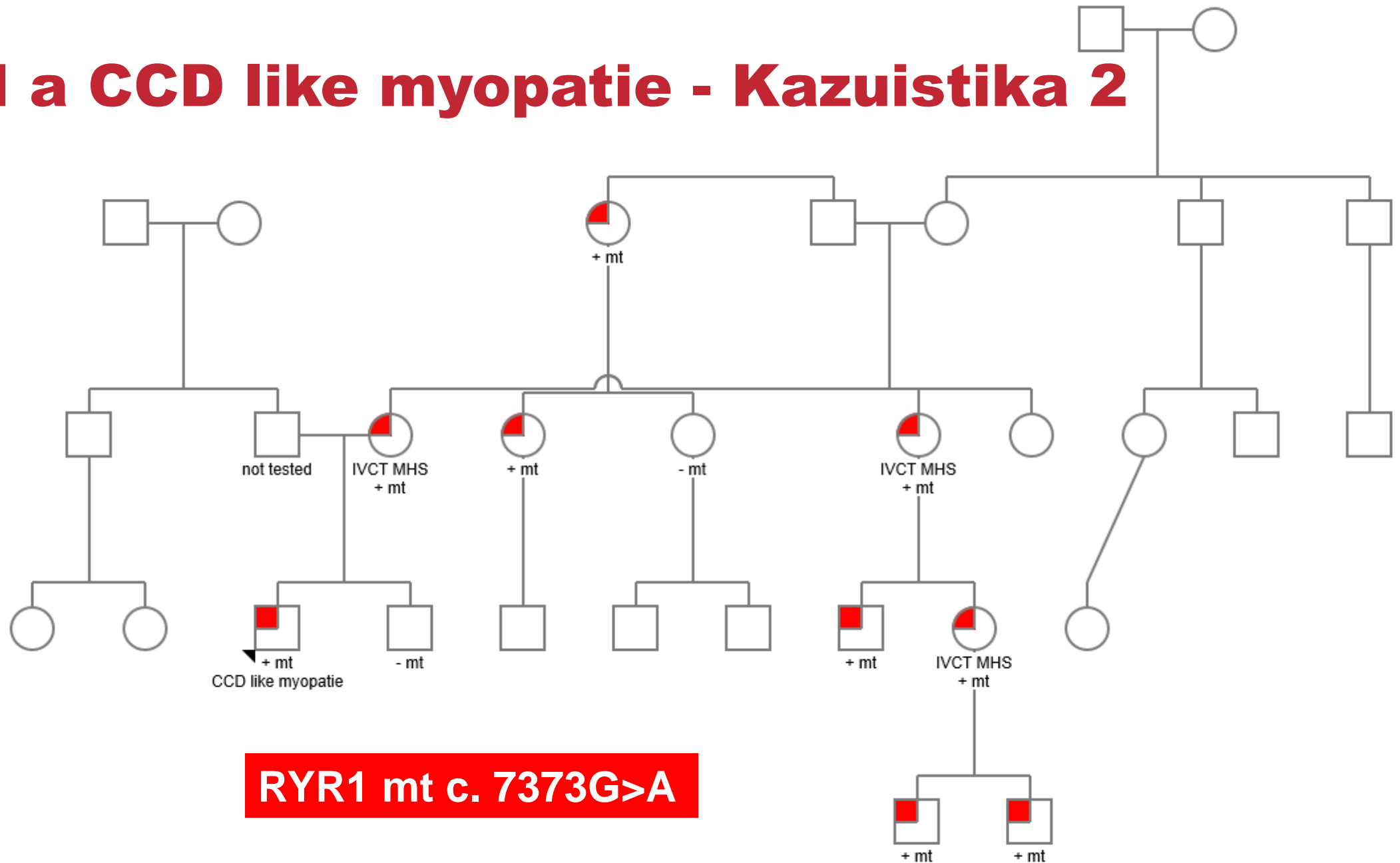


MH a CCD like myopatie - Kazuistika 2

- RA: bezvýznamná
- OA: p.hm. 2400/45, byl kříšen, v porodnici pedes calcaneovalgi, flekční kontraktury kyčlí a kolen, **motorický vývoj opožděn**. Sledován na neurologii a RHB, cvičí Vojtu. Přijat na ortopedii k operaci talus verticalis v 12/2002, kdy ještě nechodí. Sledován dále na alergologii - Zyrtec gtts 5-0-5. Měl opakovaně vysoké teploty 41 °C. Při anginách měl i febrilní křeče.
- Úvod do anestezie **Halotanem** (max 2,5%), pokus o intubaci v hluboké inhal. anestezii pro antepozici neúspěšný, **přidán SCCHJ 10mg** - poté výrazný **trismus**, bradykardie. Prodýcháván O₂, po odeznění SCCH začíná spontánně ventilovat, přidán Rapifen a Thiopental, zaintubován a **výkon proveden v TIVA** (Diprivan, Sufenta, AIR/O₂). Pacient dále hemodynamicky stabilizován, bez arytmií, zaznamenán **mírný vzestup EtCO₂**, který lze slušně kompenzovat hyperventilací. Po výkonu na kanyle předán na ARO. Mírná respirační acidóza korigována bikarbonátem i.v. Do hodiny extubován, normoventilace, jen hodně zahleněný. Pooperační monitorace vitálních funkcí, kontrola laboratorních markerů.
- **Později doplněno - CCD-like myopatie!!!!** DNA analýza DMD: non del 19 vytipovaných exonů genu pro dystrofin. Neurolog. dg. CCD




MH a CCD like myopatie - Kazuistika 2



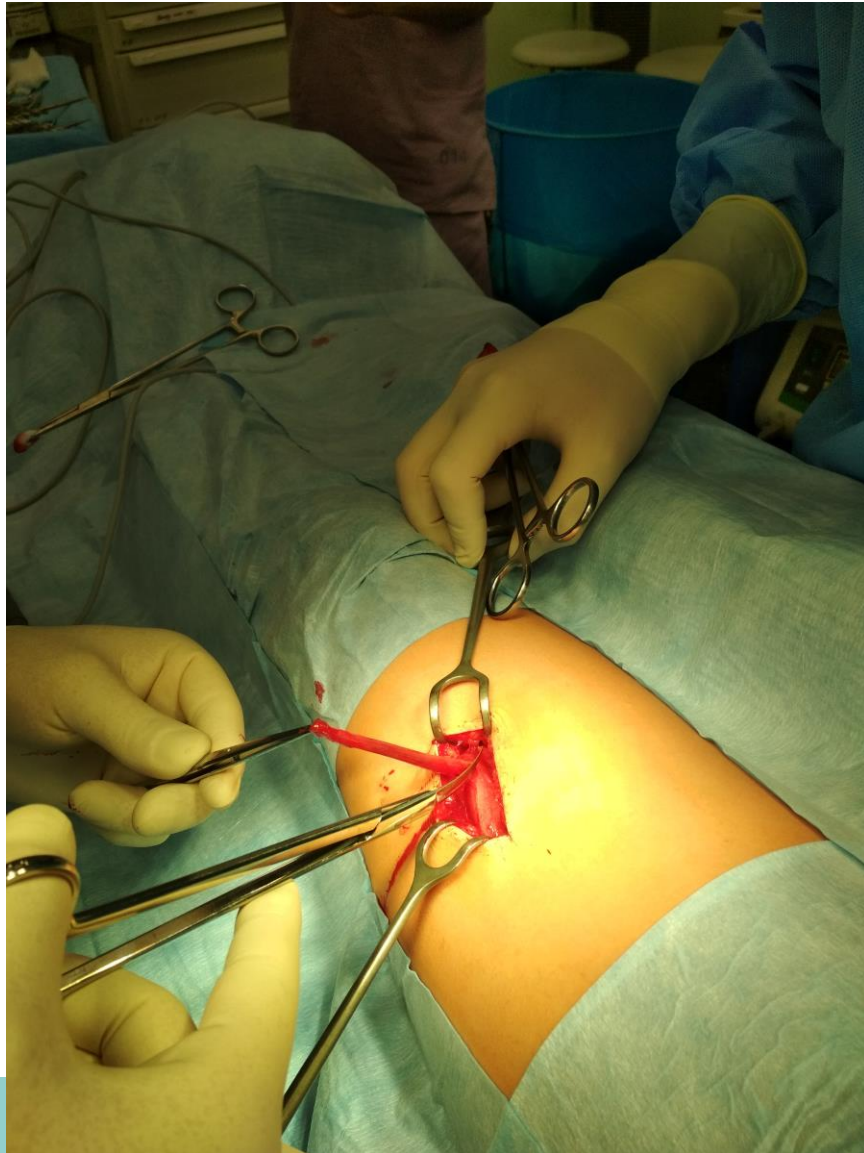
RYR1 mt c. 7373G>A

Shrnutí

- Hledáme mutace v RYR1 genu pro ryanidinový receptor a v CACNA1S genu pro dihydropyridinový receptor
 - Seznam diagnostických mutací dostupný na webu EMHG
 - 1. krok MLPA, 2. krok Hot spots sekvenace  NGS?
- + **Genetické vyšetření je miniinvazivní – pouze odběr venózní krve**
- + **Při nalezení diagnostické mutace lze prokázat MH bez provedení IVCT**
- + **Podstatně méně zatěžující pro diagnostiku v rodině**
- **Výsledek není dostupný ihned, ale trvá několik měsíců**
- **Při nenalezení diagnostické mutace nelze MH vyloučit – potřeba doplnit IVCT**



Odběr svalů vs. odběr krve



Děkuji za pozornost

Snad nejste již maligně přehřátí... 😊

UNIVERSITY HOSPITAL BRNO
FACULTY OF MEDICINE
MASARYK UNIVERSITY



**DEPARTMENT OF PAEDIATRIC
ANAESTHESIOLOGY
AND INTENSIVE CARE MEDICINE**

1 
years

AKUTNĚ.CZ®

ODBORNÝ PROGRAM A REGISTRACE XI. KONFERENCE AKUTNĚ.CZ

16.11.2019

25. 9. 2019 ...sejdeme se na AKUTNĚ.CZ...

Dovolujeme si pozvat všechny příznivce akutní medicíny na XI. konferenci AKUTNĚ.CZ, která se bude konat v sobotu 16. listopadu 2019 v Brně v prostorách Univerzitního kampusu Bohunice.

Registrace na konferenci bude zahájena 2. října 2019. V případě zájmu o zrušení již existující registrace nás prosím informujte na e-mail sekretariat@akutne.cz.

Poděkování partnerům XI. konference AKUTNĚ.CZ

I letos pro Vás připravujeme několik paralelních sekcí: Dětská anestezie a intenzivní péče, POJĎTE SI HRÁT!!! aneb HRAČKY pro anesteziology, Porodnická anestezie a analgezie, Sekce mladých anesteziologů a intenzivistů a samozřejmě nelékařská paralelní sekce.



Registrace na konferenci bude zahájena 2. října 2019. Registrace na workshopy bude následně zpřístupněna pod stejnými přihlašovacími údaji 15. října 2019.