

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Aleksandra S. Miletić

**DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENOMSKIH  
ABNORMALNOSTI KOD NOVOROĐENČADI SA  
KRITIČNO TEŠKIM UROĐENIM SRČANIM  
MANAMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Aleksandra S. Miletić

**DETECTION AND CHARACTERIZATION OF  
GENOMIC ABNORMALITIES IN NEWBORNS  
WITH CRITICAL CONGENITAL HEART DISEASE**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

Mentor:

**Prof. dr Goran Čaturilo**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Komentor:

**Prof. dr Vojislav Parezanović**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. **Prof. dr Ivana Novaković**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

2. **Prof. dr Milan Đukić**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

3. **Prof. dr Ivana Kavečan**, Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## **ZAHVALNIICA**

*Zahvaljujem se prof. dr Goranu Čuturilu i prof. dr Vojislavu Parezanoviću na ukazanom poverenju, podršci i dragocenim savetima prilikom izrade disertacije. Hvala dr sci med. Jeleni Ruml Stojanović i svim kolegama iz Službe kliničke genetike Univerzitetske dečje klinike na bezrezervnoj pomoći, razumevanju i solidarnosti. Veliko hvala prof. dr Ivani Novaković i svim saradnicima Laboratorije za molekularnu i genetičku dijagnostiku, Klinike za neurologiju, Kliničkog Centra Srbije, višem naučnom saradniku Danijeli Drakulić i celom timu Laboratorije za humanu molekularnu genetiku, Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, kao i doc. dr Ivanu Soldatoviću iz Instituta za medicinsku statistiku i informatiku, Medicinskog fakulteta, na srdačnoj saradnji i nesebičnoj pomoći tokom sprovođenja istraživanja.*

*Neizmerno hvala mojoj porodici i prijateljima na beskrajnoj podršci, motivaciji i razumevanju.*

# DETEKCIJA I KARAKTERIZACIJA GENOMSKIH ABNORMALNOSTI KOD NOVOROĐENČADI SA KRITIČNIM UROĐENIM SRČANIM MANAMA

## SAŽETAK

**Uvod:** Urođene srčane mane (USM) predstavljaju strukturne abnormalnosti srca i velikih krvnih sudova prisutne na rođenju. Sa učestalošću od 0,8-1,2% u populaciji novorođenih, one predstavljaju najčešće urođene mane kod ljudi. Epidemiološke studije su pokazale da 20-30% USM nastaje kao posledica genetičkih faktora i da su submikroskopske promene u broju kopija (engl., *Copy number variants*, CNV) najčešći genetički uzročnici USM. Novorođenčad sa kritično teškim USM predstavlja 25-30% hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima intenzivne nege. Brza i efikasna dijagnostika kod ove grupe pacijenata je od izuzetne važnosti ali često predstavlja izazov. Genetička testiranja mogu da olakšaju ovaj proces, ali nažalost nisu dostupna svim pacijentima. U razvijenim zemljama kao test prvog izbora kod pacijenata sa USM se primenjuje hromozomski *microarray*, koji detektuje CNV duž čitavog genoma. Visoka cena ovog testa često ograničava njegovu primenu u nerazvijenim zemljama gde se primenjuju dostupnije tehnologije. Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije (engl., *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA) je brza, ekonomski povoljna, visokosenzitivna, semikvantitativna analiza za simultanu detekciju CNV na 60 odabranih lokusa u jednoj reakciji. Stopa detekcije CNV kod pacijenata sa USM primenom MLPA analize je varijabilna i zavisi od selekcije pacijenata kao i od odabira MLPA kitova koji se primenjuju u testiranju.

**Ciljevi:** Ovo istraživanje je imalo za cilj da utvrdi stopu detekcije CNV MLPA analizom u cilju procene da li ova analiza može da se primenjuje kao test prvog izbora kod novorođenčadi sa kritično teškim USM hospitalizovane na Odeljenju neonatalne intenzivne nege. Dodatno, ciljevi ove studije su bili utvrđivanje učestalosti submikroskopskih genomskih abnormalnosti primenom MLPA analize, hromozomskog *microarray-a* i sekvenciranja „kliničkog egzoma“ kod novorođenčadi sa kritičnim USM hospitalizovane na Odeljenju intenzivne nege, kao i utvrđivanje korelacije detektovanih varijanti sa tipovima USM, prisustvom ekstrakardijanih malformacija i letalnog ishoda utvrđenih kod ispitanika.

**Materijal i metode:** Studija je obuhvatila 100 neselektovanih novorođenčadi sa kritično teškim USM (kompleksne ili kombinovane srčane mane), hospitalizovane na Odeljenju intenzivne nege, Univerzitetske dečje klinike u Beogradu u periodu od avgusta 2014. do septembra 2019. godine. Pacijenti sa kliničkom slikom vijabilnih trizomija (21, 18, 13) nisu uključeni u studiju. Svi ispitanici su testirani MLPA analizom primenom SALSA MLPA P250-B2 i SALSA MLPA P311-B1 kitova (*MRC Holland*, Holandija). Pacijenti sa normalnim rezultatima MLPA analize su dalje evaluirani primenom hromozomskog *microarray-a* i sekvenciranja „kliničkog egzoma“.

**Rezultati:** MLPA analiza je urađena kod 100 ispitanika primenom P311 i P250 MLPA kitova. Patogene CNV su detektovane kod 10 ispitanika. Kod devet ispitanika je utvrđena delecija regiona 22q11.2 koja je detektovana primenom oba MLPA kita, dok je kod jednog ispitanika utvrđeno prisustvo delecije regiona 3p25 koja je detektovana primenom P311 MLPA kita. Kod

26 ispitanika sa normalnim rezultatima MLPA analize je urađen aCGH. Patogene/verovatno patogene varijante su detektovane kod tri pacijenta, dok su kod četiri pacijenta detektovane varijante nepoznatog značaja (engl., *Variants of unknown significance*, VUS). Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ je urađeno kod pet pacijenata koji su imali normalne MLPA i aCGH rezultate. Statističkom obradom podataka nije utvrđena statistički značajna korelacija između detektovanih patogenih varijanti i tipova USM, prisustva ekstrakardijalnih malformacija i letalnog ishoda utvrđenih kod ispitanika.

**Zaključak:** Genomske abnormalnosti su česte kod novorođenčadi sa kritičnim USM. Ukupno, patogene/verovatno patogene varijante su detektovane kod deset novorođenčadi primenom MLPA analize, kod tri primenom hromozomskog *microarray*-a i kod tri primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“. MLPA analiza je brza, ekonomski povoljna metoda sa visokom stopom detekcije patogenih varijanti i kao takva se može primeniti kao test prvog izbora kod sve novorođenčadi sa kritično teškim USM hospitalizovane na odeljenjima intenzivne nege.

**Ključne reči:** urođene srčane mane, intenzivna nega, novorođenčad, MLPA, hromozomski *microarray*, sekvenciranje „kliničkog egzoma“

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

**UDK broj:** \_\_\_\_\_

# DETECTION AND CHARACTERIZATION OF GENOMIC ABNORMALITIES IN NEWBORNS WITH CRITICAL CONGENITAL HEART DISEASE

## SUMMARY

**Introduction:** Congenital heart defects (CHD) are structural defects of the heart and large blood vessels present at birth. With an incidence of 0.8-1.2% it is the most common birth defect and significant cause of mortality and morbidity in children. Epidemiological studies showed that genetic factors play role in 20-30% cases of CHD and that submicroscopic copy number variants (CNVs) are the most common genetic causes of CHD. Newborns with critical CHD represent 25-30% of patients in the Neonatal Intensive Care Units. Rapid and efficient diagnostics is crucial for these patients but is often challenging. Genetic tests may facilitate this process, but unfortunately they are not available for all patients. In developed countries chromosomal microarray that detects CNVs along entire genome is considered as a first-tier test for patients with CHD. High costs of this test usually limit its application in undeveloped countries that look for more affordable technologies. Multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) analysis is fast, cost-effective, high sensitive, semiquantitative analysis that allows simultaneous detection of up to 60 CNVs at selected loci in a single reaction. The rate of CNVs detection by MLPA analysis in patients with CHD varies depending on the criteria for patient selection, as well as the type of commercially available MLPA kit used for the testing.

**Aim:** The aim of this study was to determine the detection rate of CNVs by MLPA analysis in order to assess whether this analysis can be applied as a first-tier test in newborns with critical CHD admitted to the Neonatal Intensive Care Units. Additionally, the frequency of submicroscopic genomic abnormalities using MLPA analysis, array comparative genomic hybridisation (aCGH) and clinical exome sequencing in the present cohort, as well as correlation between detected variants and CHD types, existence of extracardial malformations and lethal outcomes of participants were determined.

**Material and methods:** Study included 100 consecutive newborns admitted to the Neonatal Intensive Care Unit, University Children's Hospital in Belgrade from August 2014 to September 2019. Patients with viable trisomies (21, 18 and 13) were excluded. All participants were tested by MLPA analysis using SALSA MLPA P250-B2 Di George and SALSA MLPA P311-B1 Congenital Heart Disease probemixes (MRC Holland, The Netherlands). Those with normal MLPA findings were further evaluated by chromosomal microarray and clinical exome sequencing.

**Results:** MLPA was applied in 100 newborns using P311 and P250 MLPA kits. Pathogenic CNVs were identified in ten patients. Nine of them had 22q11.2 deletion, detected by both kits, while one patient had 3p25 deletion, detected by P311 kit. Further, aCGH was performed for 26 patients who had normal MLPA report. In three patients pathogenic/likely pathogenic CNVs were identified, while in four, variants of unknown significance (VUS) were detected. Clinical exome sequencing was performed in five patients for whom MLPA and aCGH analysis did not reveal causal variants. Pathogenic/likely pathogenic variants were identified in three of them.

Statistical analysis showed that there was no significant correlation between the detected pathogenic variants and CHD types, existence of extracardial malformations and lethal outcome.

**Conclusion:** Genomic abnormalities among newborns with critical CHD are frequent. Overall, pathogenic/likely pathogenic variants were determined in ten (10%) newborns by MLPA, three (3%) by chromosomal microarray and three (3%) by clinical exome sequencing. The most common variant detected was deletion of 22q11.2 region. MLPA analysis is fast, inexpensive method with high detection rate of pathogenic variants, and as such could be easily performed as the first-tier test in all newborns with critical CHD admitted to the Neonatal Intensive Care Units.

**Keywords:** congenital heart disease, intensive care units, newborns, MLPA, chromosomal microarray, clinical exome sequencing

**Scientific field:** Medicine

**Specific scientific field:** Molecular medicine

**UDC number:** \_\_\_\_\_



# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija i klasifikacija urođenih srčanih mana .....	1
1.2. Pregled najčešćih urođenih srčanih mana .....	2
1.2.1. Konotrunkalni srčani defekti .....	2
1.2.2. Atrioventrikularni septalni defekti.....	2
1.2.3. Anomalije izlaznog trakta.....	2
1.2.4. Septalni defekti .....	3
1.2.5. Heterotaksija.....	4
1.2.6. Anomalije utoka plućnih vena.....	4
1.3. Uzroci nastanka urođenih srčanih mana.....	4
1.3.1. Urođene srčane mane kao posledica hromozomskih aneuploidija .....	5
1.3.2. Genske mutacije kao uzrok nastanka urođenih srčanih mana .....	5
1.3.3. Promene u broju kopija kao uzrok nastanka urođenih srčanih mana .....	10
1.3.4. Promene u broju kopija i sindromske forme urođenih srčanih mana .....	10
1.3.5. Promene u broju kopija i izolovane urođene srčane mane .....	12
1.3.6. Drugi genetički uzročnici urođenih srčanih mana .....	12
1.4. Molekularna osnova urođenih srčanih mana.....	13
1.4.1. Embrionalno razviće srca .....	13
1.4.2. Molekularna genetika urođenih srčanih mana.....	15
1.5. Rizik za rekurenciju.....	17
1.6. Detekcija genomskih abnormalnosti kod pacijenata sa urođenim srčanim manama .....	18
1.6.1 Kariotip.....	18
1.6.2. Fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija.....	19

1.6.3. Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije (MLPA) .....	19
1.6.4. Metoda molekularne kariotipizacije (hromozomski <i>microarray</i> ) .....	21
1.6.5. Sekvenciranje pojedinačnih gena po Sangeru .....	22
1.6.6. Sekvenciranja gena primenom tehnologije naredne generacije sekvenciranja .....	22
1.7. Odabir genetičkog testa .....	24
1.8. Značaj genetičkih testiranja za pacijente sa urođenim srčanim manama .....	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	27
3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE.....	28
3.1. Ispitanici .....	28
3.2. Dizajn studije.....	28
3.3. Biološki materijal .....	29
3.4. Metode.....	30
3.4.1. Izolacija DNK metodom iseljavanja po Milleru .....	30
3.4.2. Izolacija DNK primenom kita za ekstrakciju DNK uz upotrebu kolona.....	30
3.4.3. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK.....	31
3.4.4. Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije .....	31
3.4.5. Hromozomski <i>microarray</i> .....	33
3.4.6. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ .....	34
3.4.7. Baze podataka.....	35
3.4.8. Statistička analiza podataka.....	36
4. REZULTATI.....	37
1.1. Rezultati kliničke evaluacije ispitanika .....	37
1.2. Rezultati MLPA analize .....	38
1.3. Rezultati hromozomskog <i>microarray</i> -a .....	44
4.4. Rezultati sekvenciranja „kliničkog egzoma“ .....	51

4.5. Stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih varijanti .....	52
4.6. Rezultati statističke analize .....	53
5. DISKUSIJA .....	57
6. ZAKLJUČCI.....	71
7. LITERATURA .....	72

# 1. UVOD

## 1.1. Definicija i klasifikacija urođenih srčanih mana

Urođene srčane mane (USM) predstavljaju strukturne abnormalnosti srca i velikih krvnih sudova prisutne na rođenju (Zaidi and Bruckner, 2018). Sa učestalošću od 0,8-1,2 % u populaciji novorođenih, one predstavljaju najčešće urođene mane kod ljudi. U svetu se godišnje rodi oko 1,35 miliona dece sa USM sa različitom težinom kliničke slike, a dijagnoza kod više od 50% pacijenata se postavlja u prvom mesecu života (Fahed *et al.*, 2013).

USM nastaju kao posledica narušenih procesa tokom embriogeneze srca, a uzrokuju poremećaje u krvotoku, zbog čega može da nastane disfunkcija kardiovaskularnog sistema i multisistemsko organsko popuštanje sa mogućim letalnim ishodom (Sommer *et al.*, 2008). Zahvaljujući savremenoj dijagnostici, terapiji i naprednim hirurškim intervencijama životni vek obolelih se značajno produžava, što pokazuje povećanje broja pacijenata sa kompleksnim USM u adultnoj populaciji (Gilboa *et al.*, 2016). Uprkos tome, USM su i dalje značajan uzrok mortaliteta i morbiditeta kod dece, te su stoga predmet brojnih naučnih istraživanja (Richards and Garg, 2010).

Zbog izuzetne heterogenosti, jedinstvena klasifikacija USM ne postoji. USM mogu da se jave izolovane ili udružene sa malformacijama drugih organskih sistema kada se nazivaju sindromskim. Takođe, USM mogu biti proste i kompleksne. Kompleksne USM predstavljaju istovremeno prisustvo više tipova prostih USM (Fahed and Nemer 2012). Botto i saradnici su napravili klasifikaciju koja se često koristi u etiološkim istraživanjima USM, a koja je zasnovana na anatomskim karakteristikama, epidemiološkim aspektima i stepenu kompleksnosti srčanih defekata. Prema ovoj klasifikaciji USM su podeljene u 11 grupa (Botto *et al.*, 2007):

1. konotrunkalne USM
2. atrioventrikularni sepetlani defekti (AVSD)
3. anomalije utoka plućnih vena
4. opstrukcija izlaznog trakta leve komore (engl., *left ventricular outflow tract obstruction*, LVOTO)
5. opstrukcija izlaznog trakta desne komore (engl., *ventricular outflow tract obstruction*, RVOTO)
6. septalni defekti
7. heterotaksija
8. jednokomorno srce/kompleksne USM
9. septalni defekti+LVOTO
10. septalni defekti +RVOTO
11. druge asocijacije.

## 1.2. Pregled najčešćih urođenih srčanih mana

### 1.2.1. Konotrunkalni srčani defekti

Konotrunkalne srčane mane nastaju kao posledica abnormalne septacije aortnog i pulmonalnog izlaznog trakta (Kloesel *et al.*, 2016). U ovu grupu srčanih defekata se ubrajaju:

1. tetralogija Fallot (engl., *Tetralogy Fallot*, TOF), srčana mana koju čine četiri elementa: veliki subaortni ventrikularni septalni defekt (engl., *ventricular septal defect*, VSD), RVOTO, dekstroponirana jašuća aorta i hipertrofija desne komore
2. dvostruko ishodište velikih arterija iz desne komore (engl. *double outlet right ventricle*, DORV), srčani defekt kod koga aorta i plućna arterija izlaze iz desne komore
3. zajednički arterijski trunkus (engl., *truncus arteriosus communis*) USM u kojoj stablo pulmonalne arterije i ascendentni deo aorte izlaze kao jedan sud iz obe komore
4. prekid aortnog luka tip B i C
5. konoventrikularni septalni defekt
6. transpozicija velikih arterija (engl., *transposition of the great arteries*, TGA) anomalija kod koje su aorta i plućna arterija zamenile mesta tako da izlaze iz pogrešnih komora (Botto *et al.*, 2007).

### 1.2.2. Atrioventrikularni septalni defekti

AVSD uključuje abnormalnost atrijalnog i ventrikularnog septuma kao i abnormalnosti mitralnih i trikuspidnih valvula. AVSD može biti kompletan i parcijalan. Kompletan AVSD podrazumeva defekte kako u regionu atrioventrikularnog septuma tako i u predelu valvularnog regiona, pri čemu tokom embrionalnog razvića nije došlo do razdvajanja mitralnih od trikuspidnih valvula već su one ostale kao jedna celina (Kliegman *et al.*, 2011). Parcijalni AVSD uključuje atrijalni septalni defekt (engl., *atrial septal defect*, ASD) tipa ostium primum, uz prisustvo rascepa mitralnog zalistaka, dok su mitralne i trikuspidne valvule pravilno razdvojene, ali mogu biti na pogrešnom mestu (Setty and Shen, 2006).

### 1.2.3. Anomalije izlaznog trakta

Anomalije izlaznog trakta predstavljaju stenotične lezije izlaznog trakta leve i desne komore sa posledičnim sistolnim opterećenjem komora. Ova grupa srčanih defekata uključuje RVOTO i LVOTO.

RVOTO uključuje:

1. pulmonalnu atreziju odnosno odsustvo pulmonalne valvule
2. Ebstein anomaliju koja podrazumeva abnormalnost trikuspidnog zaliska, odnosno njegovog pomeranja ka desnoj komori sa distalnim pomeranjem trikuspidnih listića ka vrhu desne komore
3. stenozu pulmonalne valvule koja otežava protok krvi iz desne komore u pulmonalnu arteriju
4. trikuspidnu atreziju odnosno odsustvo trikuspidne valvule između desne pretkomore i desne komore (Botto *et al.*, 2007)

LVOTO uključuje:

1. stenozu aortne valvule koja podrazumeva suženje aortne valvule između leve komore i aorte. Ovaj defekt je često povezan sa drugim USM kao što su stenoza mitralne valvule i koarktacija aorte u takozvani Shone-ov kompleks
2. atreziju aortne valvule tj. odsustvo aortne valvule koja povezuje levu komoru i aortu
3. supravavularnu aortnu stenozu odnosno suženje ascendentne aorte
4. prekid aortnog luka tip A odnosno prekid između ascendentnog i descendentnog dela aorte
5. koarktaciju aorte odnosno suženje aorte koje se primarno nalazi u istmusu aorte
6. sindrom hipoplazije levog srca koji predstavlja grupu udruženih stenotičnih defekata koji rezultuju nedovoljno razvijenim levim delom srca (leva komora, aortnih i mitralnih valvula i ascendentni deo aorte)
7. bikuspidnu aortnu valvulu (Kliegman *et al.*, 2011)

#### 1.2.4. Septalni defekti

Septalni defekti predstavljaju otvore u pregradi koji dele levu i desnu pretkomoru kao i levu i desnu komoru srca dovodeći do mešanja krvi bogate kiseonikom iz levog dela srca sa krvlju osiromašenom kiseonikom iz desnog dela srca (Kloesel *et al.*, 2016).

ASD predstavlja otvor na pregradi između pretkomora. Prema lokalizaciji defekta može biti: otvoreni foramen ovale, defekt tipa ostium primum, ostium secundum, sinus venosus defekt, defekt koronarnog sinusa i zajednička pretkomora (Geva *et al.*, 2014).

VSD je otvor između komora, a prema svom položaju može biti: membranozni, muskularni, inlet, subarterijski i *double comited* (Minette and Sahan, 2006).

Septalni defekti se najčešće javljaju izolovani, a mogu se javiti i udruženi sa drugim srčanim anomalijama. Ovi defekti srca nastaju kao posledica hipoplazije dorzalne mezenhimealne protruzije, strukture koja se formira tokom embrionalnog razvića srca kao i poremećaja procesa apoptoze i ćelijske migracije (Kloesel *et al.*, 2016).

### 1.2.5. Heterotaksija

Heterotaksija označava abnormalnosti koje nastaju usled narušene levo-desne osne determinacije tokom embrionalnog razvića što dovodi do poremećaja u pozicioniranju unutrašnjih organa. Poremećaj levo-desne osne orijentacije nastaje veoma rano tokom embrionalnog razvića, a javlja se kao posledica grešaka u primitivnom čvoru. Primitivni čvor je embrionalna struktura koja ima funkciju organizatora u uspostavljanju pravilne levo-desne osne orijentacije tako što reguliše ekspresiju gena i formiranje koncentracionog gradijenta signalnih proteina neophodnih za proces ćelijske migracije tokom embriogeneze (Kloesel *et al.*, 2016). Narušavanjem procesa levo-desne orijentacije ne dolazi samo do anomalija srca i krvnih sudova, već ovaj kompleksni poremećaj uzrokuje abnormalnosti i drugih organa (gastrointestinalni trakt, respiratorni trakt, genitourinarni trakt, anomalije centralnog nervnog sistema i dr.) (Kothari, 2014).

Poremećaji srca koji se javljaju u sklopu heterotaksije obično rezultuju kompleksnim srčanim defektima kao što su univentrikularno srce, pulmonalna stenoza/atrezija, totalni anomalni utok plunih vena, TGA, TOF, DORV, AVSD i dr. (Shiraishi *et al.*, 2012).

### 1.2.6. Anomalije utoka plućnih vena

Anomalni utok plućnih vena uzrokuje drenažu jedne ili više plućnih vena u sistemsku cirkulaciju (Paladini *et al.*, 2018.). Postoje dva tipa:

1. totalni anomalni utok plućnih vena (engl., *total anomalous pulmonary venous return*, TAPVR), anomalija kod koje se sve plućne vene dreniraju u sistemske vene ili desnu pretkomoru umesto u levu pretkomoru
2. parcijalni anomalni utok plućnih vena (engl., *partial anomalous pulmonary venous return*, PAPVR), anomalija kod koje se jedna ili nekoliko plućnih vena uliva u sistemske vene ili desnu pretkomoru umesto u levu pretkomoru (Kliegman *et al.*, 2011).

## 1.3. Uzroci nastanka urođenih srčanih mana

USM mogu da nastanu kao posledica genetičkih i negenetičkih (sredinskih) faktora ili njihovim zajedničkim delovanjem (multifaktorske USM) (Richards and Garg, 2010). Među negenetičkim uzročnicima nastanka USM, koje uzrokuju oko 2% USM, izdvajaju se teratogeni agensi, infekcije (Rubela), oboljenja majke (gojaznost, dijabetes, fenilketonurija) kao i alkoholizam (Jenkins *et al.*, 2007).

Epidemiološke studije pokazuju da 20-30% USM nastaje kao posledica isključivo genetičkih faktora. Od toga u 3-5% slučajeva USM nastaju kao posledica monogenskih defekata. U 8-10% slučajeva nastaju kao posledica hromozomskih aneuploidija, dok u 3-25% slučajeva nastaju kao posledica submikroskopskih hromozomskih rearanžmana, prisutnih u različitom broju kopija (engl., *Copy number variants*, CNV) (Pierpont *et al.*, 2018). Genomske abnormalnosti koje uzrokuju nastanak USM mogu biti nasleđene po različitim obrascima Mendelovih pravila nasleđivanja ili pak mogu da se jave po prvi put kada se označavaju kao *de novo* mutacije. Nasleđene mutacije karakteriše različit stepen penetrantnosti i ekspresivnosti koji za posledicu može imati širok spektar fenotipskih karaktersitika (Simmons *et al.*, 2017).

### 1.3.1. Urođene srčane mane kao posledica hromozomskih aneuploidija

Hromozomske aneuploidije su abnormalnosti u broju hromozoma koje obično dovode do anomalija više organskih sistema uključujući i kardiovaskularni (Pierpont *et al.* 2018). USM su prisutne kod 35% do 50% pacijenata sa trizomijom hromozoma 21 (Down sy), 60 do 80% pacijenata trizomijom hromozoma 13 i 18 (Patau i Edwards sy) i kod 33 % pacijenata sa monozomijom X hromozoma (Turner sy) (Zaidi and Brueckner, 2017). U literaturi se još kod pacijenata sa USM opisuju i aneuploidije hromozoma 8 i 9 koje se javljaju jako retko i obično su prisutne u mozaičnom obliku (Pierpont *et al.*, 2018).

Istraživanja su pokazala da USM koje prate hromozomske aneuploidije ne nastaju kao posledica globalne promene količine genetičkog materijala, već one nastaju kao posledica dozno zavisnih gena pozicioniranih na zahvaćenim hromozomima (Fahed *et al.*, 2013). Narušavanje dozne zavisnosti velikog broja gena čini veliki izazov u razgraničavanju koji su geni odgovorni za nastanak USM, a koji za abnormalnosti drugih sistema. Ipak, napredak nauke i tehnologije je omogućio prevazilaženje ovakvih nedoumica kod pojedinih sindroma. Tako je pokazano da *DSCAM* i *COL6A* gen imaju ulogu u nastanku USM kod Down sindroma (Zaidi and Brueckner, 2017). Dodatno, eksperimenti na miševima su pokazali da prekomerna ekspresija samo *DSCAM* gena ili samo *COL6A* gena ne dovodi do nastanka USM, već da USM nastaju u slučaju istovremene prekomerne ekspresije oba ova gena. Rezultati ovih eksperimenata ukazuju na značaj sinergične genske interakcije u etiologiji nastanka USM (Grossman *et al.*, 2011).

### 1.3.2. Genske mutacije kao uzrok nastanka urođenih srčanih mana

Genske mutacije predstavljaju promene nukleotidne sekvence određenih gena. U nekim slučajevima ta promena nukleotidne sekvence nema posledicu na fenotip jer ona ne dovodi do promene aminokiselinske sekvence, pa samim tim nema ni uticaja na protein. Međutim, određene genske mutacije drastično menjaju strukturu i funkciju proteina. Ove promene se mogu ostvariti sledećim mehanizmima:



- uvođenjem prevremenog STOP kodona, koji preveremeno zaustavlja proces transkripcije što se odražava i na proces translacije, odnosno sinteze proteina
- insercijom različitih amino kiselina u kritični region proteina, što dovodi do smanjenja/gubitaka funkcije proteina (engl., *loss of function mutation*) ili pak dovodi do nekontrolisane ili neke nove funkcije proteina (engl., *gain of function mutation*) (Simmons and Brueckner, 2017).

Genske mutacije mogu uzrokovati kako sindromske tako i nesindromske forme USM (Tabela 1 i Tabela 2) (Pierpont *et al.*, 2018). Procenjeno je da je oko 2% USM uzrokovano nasleđenim, dok oko 10 % slučajeva uzrokovano *de novo* varijantama (Simmons and Brueckner 2017). Nasleđene varijante često pogađaju gene za transkripcione faktore i signalne molekule koji svoje funkcije ostvaruju tokom procesa embrionalnog razvića, kao i gena čiji proteinski produkti učestvuju u izgradnji ćelijskih struktura. *De novo* varijante pogađaju gene odgovorne za razviće više organskih sistema, kao što su geni koju učestvuju u procesu remodelovanja hromatina, ključnog procesa u regulaciji ekspresije gena, kao i gena koji učestvuju u signalnim putevima koji učestvuju u ćelijskoj komunikaciji (Zaidi and Brueckner, 2017). Generalno, *de novo* varijante imaju štetniji efekat na fenotip i uzrokuju nastanak komorbiditeta (Simmons and Brueckner, 2017). Značaj pomenutih gena u embrionalnom razviću srca je detaljno opisan u poglavlju 1.4.

Osim promena u nukleotidnoj sekvenci i alteracije na različitim nivoima genske ekspresije mogu imati uticaja u nastanku USM. Proces transkripcije gena može biti regulisan na nivou transkripcionih faktora koji se vezuju za različite DNK sekvence, što može dovesti do pojačavanja ili utišavanja ekspresije određenog gena. Takođe, transkripcija gena može biti regulisana i na nivou histonskih proteina, oko kojih je DNK namotana, a koji utiču na dostupnost sekvenci za prilaz molekula neophodnih za proces transkripcije (Kloesel *et al.*, 2008). Dodatno, u regulaciji genske ekspresije učestvuju i nekodirajući RNK molekuli koji posreduju kako u vezivanju transkripcionih faktora za ciljne sekvence tako i u remodelovanju hromatina. Regulatorni RNK molekuli mogu da se vežu za iRNK molekule i tako onemogućavaju proces translacije ili da dovodu do razgradnje iRNK, što za krajnu posledicu može imati nedostatak proteina ili njegovu smanjenu količinu (Garcia-Padilla *et al.*, 2018). Ekspresija gena može biti regulisana i procesom alternativnog splajsovanja, koji podrazumeva koršćenje različitih mesta iskrajanja introna tokom procesa obrade molekula iRNK, pre odvijanja procesa translacije. Ovaj proces može da uzrokuje sintezu različitih proteinskih izoformi, među kojima neke mogu imati različite funkcije. Posttranslacione modifikacije proteina (fosforilacija, metilacija, acetilacija i dr.) takođe imaju uticaja na funkcionalnost proteina. S obzirom da je put od genske sekvence do nastanka funkcionalnog proteina kompleksan, treba imati u vidu da USM mogu nastati i kao posledica defekata na nivou gena, iako je genska struktura očuvana (Kloesel *et al.*, 2008).

Tabela 1. Najčešći geni koji uzrokuju sindromske forme USM.

Sindrom	Gen	Lokus	USM	% USM	Druge kliničke manifestacije	Referenca
Noonan	<i>PTPN11</i>	12q24.3	PVS, ASD, TOF, AVSD, HCM. VSD, PDA	75	nizak rast, kratak vrat, ptoza, hipertelorizam, deformiteti pektusa, kriptorhidizam	Romano <i>et al.</i> , 2009
	<i>SOS1</i>	2p22.1				
	<i>RAF1</i>	3p25.2				
	<i>KRAS</i>	12p12.1				
	<i>NRAS</i>	1p13.2				
	<i>RIT1</i>	1q22				
	<i>SHOC2</i>	10q25.2				
	<i>SOS2</i>	14q21.3				
	<i>BRAF</i>	7q34				
CFC	<i>BRAF</i>	7q34	PVS, ASD, HCM	75	kovrdžava kosa, problemi sa hranjenjem, kašnjenje u razvoju, intelektualne poteškoće	Pierpont <i>et al.</i> , 2014
	<i>KRAS</i>	12p12.1				
	<i>MAP2K1</i>	15q22.31				
	<i>MAP2K2</i>	19p13.3				
Allagile	<i>JAG1</i>	20p12.2	TOF, PA	>90	anomalije žučnih puteva, bubrega, pršljenova, facijalna dismorfija	Turnpenny <i>et al.</i> , 2012
	<i>NOTCH2</i>					McDaniell <i>et al.</i> , 2006

Char	<i>TFAP2B</i>	6p12.3	PDA, VSD	58	razmaknute oči, anomalije kostiju lobanje, anomalije šaka, punije usne	Satoda <i>et al.</i> , 2000 Sweeney <i>et al.</i> , 2000
CHARGE	<i>CHD7</i>	8p12	TOF, PDA, DORV, AVSD, VSD	75-85	kolobomi, atrezija hoane, anomalije uva, nagluvost, kašnjenje u razvoju, restrikcija rasta, intelektualne poteškoće	Trider <i>et al.</i> , 2017
Costello	<i>HRAS</i>	11p15.5	PVS, ASD, VSD,	44-52	nizak rast, problemi sa hranjenjem, intelektualne poteškoće	Lin <i>et al.</i> , 2011
Holt-Oram	<i>TBX5</i>	12q24.1	VSD, ASD, AVSD	50	anomalije ekstremiteta, odsustvo, hipoplazija ili trifalangealni palčevi, fkomelija	McDermott <i>et al.</i> , 2005
Kabuki	<i>KMT2D</i>	12q13	CoA, BAV, VSD, TOF,	50	restrikcija rasta, skeletne anomalije, intelektualne poteškoće	Wessels <i>et al.</i> , 2002
	<i>KDM6A</i>	Xp11.3	TGA, HLH			Hannibal <i>et al.</i> , 2011
VACTERL asocijacija	nije poznat	/	VSD, ASD, HLH, PDA, TGA, TOF, TA	53-80	anomalije pršljenova, atrezija anusa, traheozofagelana fistula, anomalije bubrega, hipoplazija palca	Al-Farqani <i>et al.</i> , 2013

Preuzeto od (Pierpont *et al.*, 2018, modifikovano). PVS-stenoza pulmonalnih valvula; ASD-atrijalni septalni defekt; TOF-tetralogija Fallot; AVSD-atrioventrikularni septalni defekt; HCM-hipertrofična kardiomiopatija; VSD-ventrikularni septalni defekt; PDA-patentni duktus arteriozus; PA-pulmonalna atrezija; DORV-dvostruko ishodište velikih arterija iz desne komore; CoA-koarktacija aorte; BAV-bikuspidna aortna valvula; TGA-transpozicija velikih arterija; HLH- hipoplazija levog srca; TA- trunkus arteriozus.

Tabela 2. Najčešći geni koji uzrokuju nesindromske forme USM.

<b>Gen</b>	<b>Tip USM</b>	<b>Referenca</b>
<b>Transkripcioni faktori</b>		
<i>GATA4</i>	ASD, VSD, AVSD, PVS, TOF	Garg <i>et al.</i> , 2003
<i>GATA6</i>	PTA, TOF	Maitra <i>et al.</i> , 2010
<i>NKX2-5</i>	ASD, TOF, HLH	Stallmeyer <i>et al.</i> , 2010
<i>NKX2-6</i>	PTA	Ta-Shma <i>et al.</i> , 2016
<i>TBX20</i>	ASD, VSD	Pan <i>et al.</i> , 2015
<b>Ćelijska signalizacija i adhezivni molekuli</b>		
<i>CRELD1</i>	ASD, VSD	Zatyka <i>et al.</i> , 2005
<i>JAG1</i>	TOF, PVS, PA	Bauer <i>et al.</i> , 2010
<i>NOTCH1</i>	BAV, AS, HLH, TOF, PVS	Preuss <i>et al.</i> , 2016
<b>Strukturni proteini</b>		
<i>MYH6</i>	ASD	Granados-Riveron <i>et al.</i> , 2010
<i>MYH7</i>	EA	Postma <i>et al.</i> , 2011

Preuzeto od (Pierpont *et al.*, 2018, modifikovano). ASD-atrijalni septalni defekt; VSD-ventrikularni septalni defekt; AVSD-atrioventrikularni septalni defekt; PVS-stenoza pulmonalnih vena; TOF-tetralogija Fallot; PTA-perzistentni trunkus arteriozus; HLH-hipoplazija levog srca; PA-pulmonalna atrezija; BAV-bikuspidna aortna valvula; AS-stenoza aortnih valvula; CoA-koarktacija aorte; EA-Ebstein anomalija; PDA-patentni duktus arteriozus; TAA-aneurizma torakalne aorte.

### 1.3.3. Promene u broju kopija kao uzrok nastanka urođenih srčanih mana

CNV predstavljaju DNK segmente >1 kb, prisutne u različitom broju kopija u odnosu na referentni genom, a koji prema svom efektu na fenotip mogu da se klasifikuju kao: benigne varijante, varijante nepoznatog značaja ili patogene varijante (Zaidi and Brueckner, 2017). Osnovu nastanka CNV čini sama arhitektura humanog genoma. Naime, repetitivne sekvence koje su sastavni deo našeg genoma, predstavljaju susprtat za inter/intrahromatidne rekombinacije tokom mejoze i mitoze (Weise *et al.*, 2012). Najveći procenat CNV nastaje procesom nealelske homologe rekombinacije (NAHR) koja je često posredovana segmentalnim duplikacijama i takozvanim ponovljenim nizovima prisutnih u malom broju kopija (engl. *low copy repeats*, LCR), koji okružuju određeni hromozomski region, a koji dele 95-99% homologije i na taj način omogućuju proces rekombinacije (Koolen *et al.*, 2006). CNV mogu da nastanu i nehomologim spajanjem krajeva (NHEJ), ćelijskim reparacionim mehanizmom kojim se popravljaju dvolančani prekidi DNK molekula, a koji ne zahteva prisutvo homologije sekvenci što se na primer dešava kod prisustva inverzija ili balansiranih translokacija kod jednog od roditelja (Stankiewicz *et al.*, 2002; Weise *et al.* 2012; Mefford *et al.*, 2009). Veličina CNV koje uzrokuju nastanak USM varira i može da odgovara veličini pojedinačnih gena ili njihovih egzona, pa sve do reda veličine velikih delecija i duplikacija koje obuhvataju milione baznih parova. Generalno, delecije rezultuju težom kliničkom slikom u odnosu na duplikacije što se objašnjava senzitivnošću dozno zavisnih gena koji ne tolerišu haploinsuficijenciju (Pierpont *et al.*, 2018).

### 1.3.4. Promene u broju kopija i sindromske forme urođenih srčanih mana

Najčešća mikrodelecija koja uzrokuje nastanak USM jeste delecija u regionu 22q11.2 koja se javlja sa učestalošću od 1:4000 (Morrow *et al.*, 2018). Ova mikrodelecija uzrokuje nastanak 22q11.2 delecionog sindroma koji karakterišu brojne fenotipske karakteristike kao što su USM, facijalni dismorfizmi, aplazija/hipoplazija timusa, hipokalcemija, imunodeficijencija, nazalni govor, rascep nepca, pojava psihijatrijskih bolesti u adolescentnom i odraslom dobu kao i blage intelektualne poteškoće (McDonald-McGinn *et al.*, 2015). USM se javljaju kod 60-70% pacijenata sa detektovanom delecijom regiona 22q11.2 (Hasten *et al.*, 2018). Najčešće su prisutne konotrunkalne malformacije kao što su TOF, zajedničko arterijsko stablo, prekid aortnog luka i druge anomalije aortnog stabla, stenoza pulmonalne valvule kao i drugi srčani defekti VSD, ASD i dr. (Pierpont *et al.*, 2018).

Molekularno genetičke analize su pokazale da region 22q11.2 sadrži osam LCR regiona. Proksimalna četiri regiona posmatrano od centromere ka telomeri dugog kraka hromozoma 22 označeni su sa A, B, C i D i predstavljaju tipični delecioni region koji je deletiran kod 87% obolelih. Ovaj tipični deletirani region odgovara veličini oko 3 Mb i sadrži 46 protein kodirajućih gena među kojima se *TBX1* gen ističe kao glavni kandidatni gen (Morrow *et al.*, 2018).

Recipročni 22q11.2 duplikacioni sindrom karakterišu anomalije organskih sistema koje su opisane i kod 22q11.2 delecionog sindroma. Kao 22q11.2 delecioni sindrom i duplikacioni sindrom karakteriše izrazita fenotipska varijabilnost, a glavna razlika ova dva sindroma jeste smanjena penetrantnost 22q11.2 duplikacionog sindroma, što i karakteriše recipročne duplikacione sindrome. Kada su u pitanju USM, uočeno je da su ove anomalije prisutne kod 20-25% obolelih (Hasten *et al.*, 2018). Iako jasnu genotipsko-fenotipsku korelaciju nije moguće utvrditi, uočeno je da se kod pacijenata sa 22q11.2 duplikacionim sindromom često javljaju septalni defekti i LVOTO udruženi sa restrikcijom rasta i neurološkim poremećajima (Saliba *et al.*, 2020; Pinchfsky *et al.*, 2017).

Williams sindrom je uzrokovan delecijom veličine od 1,5-1,8 Mb u regionu 7q11.23. Ovaj region obuhvata 26 gena među kojima je najznačajniji *ELN* gen koji kodira za elastin. Fenotip ovog sindroma karakterišu facijalna dismorfija, razvojne i intelektualne poteškoće sa specifičnim ponašanjem, USM među kojima je najčešća supravulvularna aortna stenoza, abnormalnosti vezivnog tkiva i skeletnog sistema (Morris, 2010). Kod obolelih postoji rizik za komplikacije tokom hirurških intervencija uzrokovane anestezijom, kao i za iznenadnu srčanu smrt (Wessel *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2014).

Jakobsen sindrom nastaje kao posledica terminalne delecije počev od regiona 11q23 veličine od 7 do 10 Mb. Učestalost ovog sindroma je 1:50000 do 1:100000. Njegove kliničke manifestacije su facijalna dismorfija, restrikcija rasta poremećaj rasta i kognitivnih funkcija (Favier *et al.*, 2015). Polovina obolelih ima USM koje zahtevaju hirurške intervencije. 75% obolelih ima VSD i LVOTO, dok se kod preostalih 25% pacijenata javljaju TGA, zajednički trunkus arteriozus, dekstrokardija i druge srčane malformacije (Pierpont *et al.*, 2018).

Delecija regiona 1p36 uzrokuje nastanak 1p36 delecionog sindroma, čija je učestalost 1:5000 do 1:10000. Ovaj mikrodelecioni sindrom predstavlja drugi najčešći mikrodelecioni sindrom koji se manifestuje zaravnjenim izgledom lica, intelektualnim poteškoćama hipotonijom, epilepsijom, strukturnim abnormalnostima mozga, USM, poremećajima sluha i vida, skeletnim i urogenitalnim anomalijama. Od USM često se sreću ASD, VSD, abnormalnosti valvula kao i TOF (Battaglia *et al.*, 2008).

Delecija veličine oko 1,35 Mb u regionu 1q21, uzrokuje nastanak 1q21 delecionog sindroma, koji se manifestuje mikrocefalijom, globalnim kašnjenjem u razvoju, blagim intelektualnim poteškoćama, niskim rastom, srčanim defektima, abnormalnostima oka (strabizam, kolobomi, mikroftalmija, katarakta) i senzoneuralnom nagluvošću (Bernier *et al.*, 2016). Od USM česte su ASD, VSD, TOF, CoA, TGA i druge. Takođe, otkriven je i recipročan 1q21 duplikacioni sindrom koji se često dovodi u vezu sa USM. Česte su VSD, TGA i TOF (Digilio *et al.*, 2013).

Kod pacijenata sa USM često se detektuje i delecija regiona 8p23.1, koja uzrokuje nastanak 8p23.1 delecionog sindroma. Pored USM, u fenotipu ovog sindroma prisutni su: dijafragmalna hernija, poremećaj rasta, problemi sa ponašanjem, hiperaktivnost i intelektualne poteškoće. USM koje prate ovaj sindrom su ASD, AVSD i DORV (Wat *et al.*, 2009).

### 1.3.5. Promene u broju kopija i izolovane urođene srčane mane

Iako su mnogo češće kod sindromskih formi USM, CNV mogu uzrokovati i nastanak nesindromskih USM (Breckpot *et al.*, 2011). Greenway i saradnici su kod pacijenata sa TOF identifikovali nekoliko retkih *de novo* CNV koje obuhataju *TBX1* gen, *JAG1* gen, i *NOTCH1* gen za koje je pokazano da uzrokuju nastanak USM. Sprovedenom studijom su zaključili da 10% sporadičnih, nesindromskih TOF može nastati kao posledica CNV (Greenway *et al.*, 2009).

### 1.3.6. Drugi genetički uzročnici urođenih srčanih mana

Nekodirajući RNK (ncRNK) molekuli predstavljaju regulatorne RNK molekule koji se generalno mogu podeliti u dve grupe. Prvu grupu čine nekodirajuće RNK čija je dužina manja od 200 nukleotida među kojima su najviše istražene mikro RNK (miRNK). Drugu grupu čine nekodirajuće RNK (lncRNK) čija je dužina veća od 200 nukleotida (Garcia-Padilla *et al.*, 2018). S obzirom da razviće srca prati i vremenski specifična genska ekspresija, smatra se da ncRNK kao regulatorni molekuli koji regulišu ekspresiju specifičnih gena koji učestvuju u razviću srca, mogu imati uticaja na nastanak USM. Mikro RNK (miRNK) su mali, jednolančani molekuli, veličine oko 22 nukleotida, koji imaju značajnu ulogu u procesima ćelijske proliferacije, diferencijacije i migracije što objašnjava njihovu ulogu u patogenezi USM (Ikeda *et al.*, 2007). Do sada je identifikovan veliki broj mikro RNK koje se povezuju sa nastankom USM. Među njima najznačajnije su: miR-1 (miR-1-1, miR-1-2, miR-206) i miR-133 (miR-133a-1, miR-133a-2, miR133b), miR-15 (miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-195, miR-497), miR-208 (miR-208a, miR-208b, miR-499), mir-218-a-1, miR-218-a-2, mir-218-b i druge (Nagy *et al.*, 2019). Među lncRNK koji se dovode u vezu sa nastankom USM najznačajnije su: Carmn, Alen, Upperhand, lncRNA-uc.167, Pancr i druge. Dosadašnja saznanja ukazuju da su ovi molekuli uključeni u proces signalizacije tokom embriogeneze (Garcia-Padilla *et al.*, 2018).

Pokazano je da i epigenetički mehanizmi mogu imati uticaja u nastanku USM. Epigenetički mehanizmi podrazumevaju hemijske modifikacije DNK molekula koje se ne odnose na strukturu molekula DNK, a koji mogu da promene obrazac genske ekspresije. Dva najznačajnija epigenetička mehanizma su metilacija DNK i modifikacije histonskih molekula, odnosno proteina oko kojih je namotana DNK i koji zapravo pomažu pakovanje DNK molekula u jedro ćelije (Lim *et al.*, 2021). Smatra se da oko 600 gena reguliše proces remodelovanja hromatina. Među njima, prema dosadašnjim saznanjima, sa nastankom USM su povezani *CHD8* gen, geni čiji proteinski produkti učestvuju u formiranju BAF kompleksa kao i *PRDM6* gen koji kodira za histonsku metil transferazu (Zaidi and Brueckner, 2017).

Takođe i mozaicizam može imati udela u nastanku USM. Mozaicizam predstavlja prisustvo dve ili više genetički različitih ćelijskih linija. Citogenetičke analize su pokazale da mozaične forme trizomije hromozoma mogu uzrokovati USM bez prisustva karakterističnih ekstrakardijalnih malformacija koje inače prate hromozomske aneuploidije (Taylor *et al.*, 2011). Dodatno, u nekoliko studija je utvrđeno da je povećana učestalost mutacija u genima za

transkripcione faktore u delu srčanog tkiva zahvaćenog strukturnim defektom u odnosu na normalno srčano tkivo, što ukazuje na značaj mozaicizma u nastanku izolovanih USM (Nees and Chung, 2019).

## 1.4. Molekularna osnova urođenih srčanih mana

### 1.4.1. Embrionalno razviće srca

Embrionalno razviće srca je kompleksan i dinamičan proces koji se sastoji od višestrukih kritičnih i vremenski zavisnih koraka. Poznavanje i razumevanje bazičnih mehanizama razvića srca je esencijalno za razumevanje nastanka USM (Mitchell, 2007). U građi kako srca u razvoju tako i adultnog srca učestvuju različite populacije ćelija: miociti, fibroblasti, epikardijalne ćelije, specijalizovane ćelije konduccionog sistema, endokardijalne ćelije, glatko mišićne ćelije i endotelijalne ćelije. U početnoj fazi razvića srca učestvuju četiri grupe ćelija: ćelije prvog srčanog polja, ćelije drugog srčanog polja, ćelije nervnog grebena i ćelije proepikardijuma (Kloesel, 2016). Ćelije prvog srčanog polja učestvuju u izgradnji leve pretkomore i komore i svih drugih delova srca izuzev izlaznog trakta. Takođe, ćelije prvog srčanog polja formiraju skelet po kome se kreću ćelije drugog srčanog polja do njihovih krajnjih destinacija. Ćelije drugog srčanog polja učestvuju u formiranju desne pretkomore i komore kao i većeg dela izlaznog trakta (Kodo and Yamagishi, 2011). Ćelije nervnog grebena učestvuju u procesu septacije. Takođe, ove ćelije nastanjuju 4. 5. i 6. faringealni luk od koga se kasnije razvijaju veliki krvni sudovi (McFadden and Olson, 2002). Četvrta grupa ćelija koja učestvuje u kardiogenezi su ćelije proepikardijuma, koji predstavlja prolazni organ tokom embrionalnog razvića, koji se nalazi na dorzalnoj strani embriona (Kodo and Yamagashi, 2011). Od proepikardijuma nastaje epikardijum koji formira multipotentne ćelije od kojih nastaju srčani fibroblasti, endotelijalne ćelije koronarne vaskulature i glatko mišićne ćelije (Kloesel, 2016).

Razviće srca predstavlja organizovanu seriju molekularnih i morfogogenetskih događaja koja uključuje sledeće ključne korake:

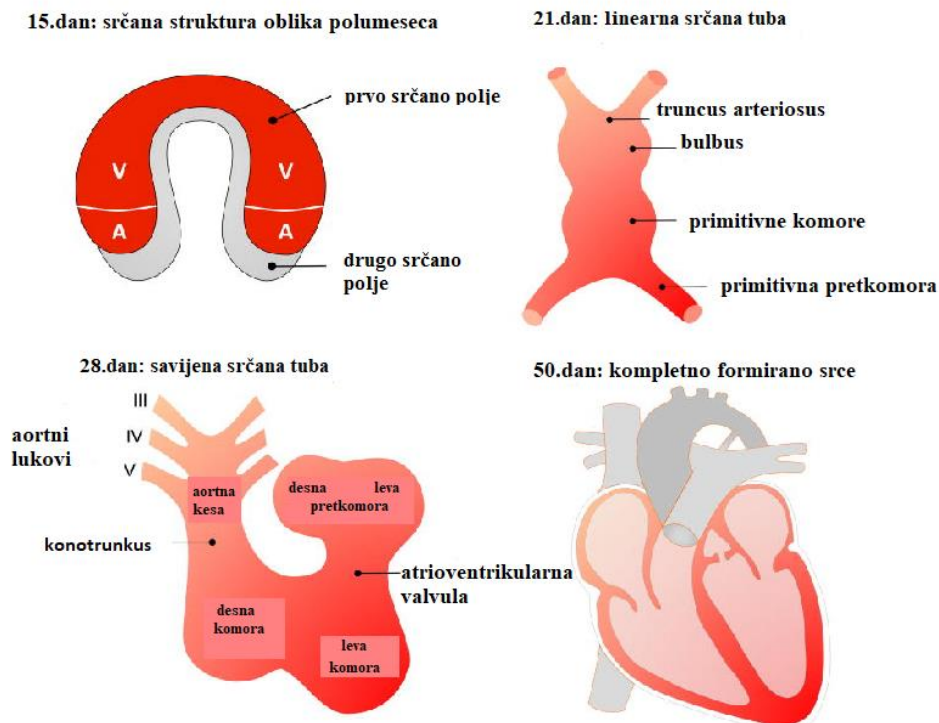
1. migraciju i grupisanje prekardijalnih srčanih ćelija koje formiraju parne strukture oblika polumeseca u miokardijalnom polju
2. spajanje polumesečastih struktura u srčanu tubu
3. uvijanje srca uz tačno i precizno poravnavanje budućih srčanih komora
4. razvoj konduccionog sistema i koronarne vaskularizacije (Mitchell *et al.*, 2007).

Kardiogeneza kod ljudi započinje 15-16. dana gestacije procesom migracije prekardijalnih stem ćelija. Ove ćelije se grupišu i formiraju parne strukture oblika polumeseca koje se još nazivaju i kardiogene ploče (Slika 1). Spajanjem ovih ploča 22. dana gestacije započinje formiranje srčane tube na kojoj se razlikuju dva pola: arterijski i venski (Kloesel *et al.*, 2016). Potom se odvija diferencijacija pojedinih delova srčane tube tako da se na njoj razlikuju sledeći delovi: trunkus arteriouzus, bulbus, preteče pretkomora i komora. Od 23.-28. dana



gestacije se odvija proces uvijanja srca. Tokom ovog procesa ćelije specifičnih regiona srčane tube se diferenciraju i formiraju primitivne komore i prelaznu zonu koje se procesom uvijanja pozicioniraju u unutrašnjost srčane tube (Mitchell *et al.*, 2007). Nakon završenog procesa uvijanja srca, 28. dana gestacije započinje proces septacije srčanih komora. Prelazna zona (od koje će se formirati pregrada) kondukcioni sistem, fibrozni srčani skelet i valvule se inkorporiraju u primitivne komore, što dovodi do oblikovanja pretkomora i komora. Čelije nervnog grebena ulaze u srce i počinju da naseljavaju miokardijum koji počinje da se kontrahuje. Proepikardijalne ćelije takođe migriraju i diferenciraju se formirajući koronarno stablo. Razviće srca se završava do 50. dana gestacije kada su formirane sve srčane strukture (Kloesel *et al.*, 2016).

Postoje brojni ćelijski i molekularni mehanizmi koji regulišu proces embriogeneze srca. Osnovni ćelijski procesi koji doprinose normalnom razviću srca su: proliferacija, diferencijacija i apoptoza. Posmatrano sa molekularnog aspekta, svi ovi procesi zahtevaju učešće velikog broja gena i njihovih proteinskih produkata koji omogućavaju da se svaki korak u toku kardiogeneze odvije tačno i precizno (Nemer, 2008). Narušavanje svakog od ovih koraka može rezultovati nastankom USM.



Slika 1. Shematski prikaz embrionalnog razvića srca. Preuzeto od (Kloesel *et al.*, 2016, modifikovano).

## 1.4.2. Molekularna genetika urođenih srčanih mana

Podaci iz literature ukazuju da je u proces embriogeneze srca uključeno oko 400 gena. Proteinski produkti ovih gena imaju ulogu transkripcionih faktora, koji iniciraju razvoj srca, determinišu razvoj ćelija koje učestvuju u formiranju srca, kontrolišu ekspresiju kontraktilnih proteina, migraciju ćelija neuralnog grebena i morfološki razvoj srčanih struktura. Mutacije u ovim genima uzrokuju nastanak USM (Williams *et al.*, 2019).

Transkripcioni faktori su proteini koji su neophodni za inicijaciju procesa transkripcije kao i za njenu regulaciju. Transkripcija predstavlja proces prevođenja genetičke informacije sadržane u molekulu DNK u RNK molekul, na osnovu koga se odvija proces translacije odnosno sinteza proteina. Transkripcioni faktori koji imaju značajnu ulogu u razviću srca a i u patogenezi USM su: NKX2-5, GATA familija transkripcionih faktora, TBX familija transkripcionih faktora, familija nuklearnih receptora, FOX i HAND familija transkripcionih faktora (Nemer 2008).

NKX2-5 transkripcioni faktor interaguje sa drugim proteinima koji imaju ulogu u kasnijim koracima razvića srca posebno u procesu septacije i razvića konduccionog sistema (Fahed and Nemer, 2012). NKX2-5 gen se eksprimira i u prvom i u drugom srčanom polju i predstavlja najraniji marker kardiomiogene diferencijacije (Li and Yang, 2017). Mutacije u ovom genu su detektovane kod pacijenata sa različitim USM koje uključuju septalne defekte (ASD, VSD), konotrunkalne i atrioventrikularne abnormalnosti (Chung and Rajakumar, 2016). U poslednje vreme, veliki broj istraživanja je fokusiran na proučavanje regulatornih regiona NKX2-5 gena. Rezultati ovih studija ukazuju da regulatorne sekvence NKX2-5 mogu da pojačaju proces transkripcije i na taj način mogu da utiču na kompleksnu mrežu koja kontroliše morfogenezu srca. Takođe, pretpostavlja se da mutirane verzije NKX2-5 transkripcionog faktora mogu da se vezuju za promotore nespecifičnih gena, to dalje može da omogući kofaktorima koji se vezuju za transkripcione faktore da indukuju jači efekat nego obično. Ovaj mehanizam može da bude jedno od objašnjenja za široki spektar fenotipskih varijacija kod obolelih (Saliba *et al* 2020).

NKX2-6 transkripcioni faktor ima sličnu funkciju tokom embrionalnog razvića srca kao i NKX2-5. Pokazano je da *loss of function* mutacije u NKX2-6 genu mogu da uzrokuju TOF, DORV i VSD (Li and Yang, 2017).

GATA familija transkripcionih faktora koju čine GATA4, GATA5 i GATA6 transkripcioni faktori, regulišu proces ekspresije gena koji su uključeni u procese diferencijacije, preživljavanja i proliferacije ćelija u različitim tkivima. Ovo su evoluciono konzervirani proteini za koje je pokazano da su esencijalni za normalno razviće srca. Eksperimenti na miševima su pokazali da smanjena ekspresija GATA gena dovodi do različitih srčanih malformacija od valvularnih i septalnih defekata pa sve do akardije (Fahed and Nemer., 2012).

GATA4 gen se eksprimira veoma rano tokom razvića, a proteinski produkt ovog gena interaguje sa NKX2.5 i regulišu ekspresiju drugih gena (Pu *et al.*, 2007). Mutacije u GATA4 genu uzrokuju ASD, VSD, TOF i AVSD. Mutacije u GATA6 su opisane kod pacijenata sa defektima izlaznog trakta. Retke varijante su opisane u GATA5 genu kod pacijenata sa TOF, VSD, familijarnom atrijskom fibrilacijom i bikuspidnom aortnom valvulom (Fahed and Nemer 2012).

TBX transkripcioni faktori (TBX1, TBX5 i TBX20) imaju ključnu ulogu u regulisanju identiteta kardiomiocita. Proteinski produkt *TBX5* gena interaguje sa NKX2-5 transkripcionim faktorom kao i sa još dva transkripciona faktora i tako sinergistički indukuju razvoj srca (Williams *et al.*, 2019). *TBX1* gen je mapiran u regionu 22q11.2 i povezuje se sa sindromskim formama USM. Zanimljivo je da se ovaj gen ne eksprimira u ćelijama nervnog grebena ali se eksprimira u ćelijama faringealnog endoderma, te na taj način indirektno može da utiče na migraciju ćelija nervnog grebena. Mutacije u *TBX20* genu su opisane kod pacijenata sa septalnim defektima, LVOTO i hipoplazijom levog srca. Funkcionalne studije su pokazale da *loss of function* kao i *gain of function* mutacije u ovom genu mogu uzrokovati USM (Posch *et al.*, 2010).

FOX familija gena kodira FOX transkripcione faktore koji takođe imaju ulogu u razviću srca. Delecije *FOXF1* i *FOXL1* gena uzrokuju nastanak hipoplazije levog srca. Mutacije u *FOXC2* genu takođe uzrokuju nastanak hipoplazije levog srca kao i TOF (Zhu, 2016).

Proteini koji izgrađuju sarkomere i ekstracelularni matriks su esencijalni za odgovarajuću strukturu i funkciju srčanog mišića. Dodatno, ćelije koje učestvuju u izgradnji srca moraju da budu sposobne za adheziju sa drugim ćelijama i ekstracelularnim matriksom da bi održale strukturu, ali i da bi se nesmetano odvijala ćelijska signalizacija. Mutacije u genima za citoskeletne elemente, miofilamente i proteine ekstracelularnog matriksa takođe dovode do nastanka USM. Neki od opisanih gena u kojima su detetovane mutacije koje se uzrokuju nastanak USM su: *MYH6*, *ACTC1*, *DCHS1*, *TTN*, *ELN*, *MYH7*, *NEXN* (Williams *et al.*, 2019).

Geni koji nose informaciju za sintezu proteina koji učestvuju u signalnim putevima su takođe od značaja za nastanak USM. Među najznačajnijim signalnim putevima koji učestvuju u nastanku USM su: NODAL, NOTCH, Wnt/ $\beta$ , BMP, SHH, RAS /Map signalizacija i dr.

NODAL signalni put je važan signalni put u kardiovaskularnom razviću koji reguliše levo-desni obrazac pozicioniranja organa. Glavnu ulogu u ovom signalnom putu ima NODAL protein, a mutacije u *NODAL* genu su opisane kod pacijenata sa TGA, konotrunkalnim defektima i hipoplazijom levog srca (Jin *et al.*, 2017). Takođe kod pacijenta sa USM su opisane mutacije u genima za proteine koji se nalaze nishodno od NODAL proteina u signalnom putu kao što su: NODAL-GDF1, CFL1, TGD1 FOXH1 i SMAD proteini (Williams *et al.*, 2019).

NOTCH signalni put kontroliše sudbinu ćelija tokom procesa diferencijacije i morfogeneze srčanih komora i valvula. NOTCH mutacije su prvobitno opisane kod pacijenata sa levostranim USM, ali kasnije su opisane i kod desnostranih kao i kod konotrunkalnih USM (Saliba *et al.*, 2020). Geni u kojima je opisan najveći broj mutacija koje su opisane kod pacijenta sa USM su: *NOTCH1*, *JAG1*, *JARID2*, *ARHGAP31*, *MAMC1* i drugi (Williams *et al.*, 2019).

Wnt/ $\beta$  katenin signalni put ima značajnu ulogu u različitim aspektima razvoja srca, naročito preko regulacije ćelijske proliferacije u sekundarnom srčanom polju. Osim u patogenezi USM, mutacije u genima čiji proteinski produkti učestvuju u ovom signalnom putu su opisane i kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima što upućuje na zajedničku genetičku etiologiju ova dva entiteta (Homsy *et al.*, 2015).

BMP signalizacija je neophodna za specifikaciju i diferencijaciju srčanog mezoderma. Takođe, BMP protein je značajan regulator ekspresije *NKX2-5* gena koji tu regulaciju ostvaruje

negativnom povratnom spregom (Rochais *et al.*, 2009). Osim mutacija u genima čiji proteinski produkti direktno učestvuju u BMP signalnom putu, mutacije koje uzrokuju nastanak USM su opisane i u *SMAD6* genu čiji proteinski produkt inhibira BMP signalizaciju. Takođe, kod pacijenta sa USM su opisane i mutacije u *GALHT1* genu za glukozotransferazu koja povećava BMP i MAPK signalizaciju dovodeći do aberantnog procesa formiranja valvula zbog povećane proliferacije (Williams *et al.*, 2019).

SHH signalizacija (engl., *Sonic Hedgehog*) ima značajnu ulogu u razvoju sekundarnog srčanog polja, procesima septacije i poravnavanja izlaznog trakta. SHH protein se sekretuje iz fariengealnog endoderma, a ovaj protein predstavlja ligand za ćelije sekundarnog srčanog polja, što dovodi do održavanja njihove proliferacije (Dyer *et al.*, 2009). Pokazano je da GATA4 transkripcioni faktor neophodan za proliferaciju SHH zavisnih ćelija kao i za proces poravnanja izlaznog trakta (Liu *et al.*, 2019). SHH signalni put reguliše i razvoj progenitorskih ćelija koje učestvuju u izgradnji desne komore, ulaznog trakta i pulmonalnog stabla. SHH signalni put je od posebnog značaja za migraciju ćelija nervnog grebena do polja od kog će se kasnije formirati izlazni trakt. Mutacije u genima koji učestvuju u SHH signalizaciji dovode do smrti ćelija nervnog grebena ili do njihove pogrešne lokalizacije (Williams *et al.*, 2019).

RAS/MAPK signalni put reguliše poliferaciju, rast i druge ćeliske procese koji imaju značajnu ulogu u nastanku USM. Mutacije u genima čiji proteinski produkti uzrokuju USM, dovode do bolesti koje se zajedničkim imenom označavaju rasopatije, među kojima je najpoznatiji Noonan sindrom (Pierpont *et al.*, 2018).

Značajnu ulogu u procesu signalizacije imaju cilije, ćelijske organele koje se nalaze na površini ćelija. Ove organele mogu biti pokretne i nepokretne. Pokretne cilije omogućuju kako kretanje ćelija tako i kretanje ekstracelularnih tečnosti (Zaidi and Brueckner, 2017). Tokom ranog embrionalnog razvića pokretne cilije generišu protok ekstracelularnog matriksa koji je odgovoran za kreiranje gradijenta signalnih molekula. Sa druge strane nepokretne cilije mogu imati ulogu provodnika ćelijskih signala ili ulogu mehanosenzora. Cilije i ćelijska signalizacija koja je posredovana cilijama mogu da modulišu polarnost ćelija i da menjaju organizaciju citoskeleta što može da ima uticaj na kardiogenezu (Williams *et al.*, 2019).

Istraživanja su pokazala da klinički različite srčane malformacije mogu da nastanu kao posledica istog genskog defekta, što ukazuje da u procesu razvića različitih srčanih struktura učestvuju isti razvojni putevi (Marín-García, 2009).

## 1.5. Rizik za rekurenciju

Rizik za rekurenciju je mnogo lakše proceniti kod sindromskih nego kod nesindromskih USM, s obzirom da je otkriven veliki broj hromozomskih i genskih abnormalnosti koji uzrokuju sindrome praćene USM, a takođe su i razjašnjeni obrasci nasleđivanja za mnoge od njih. Kod onih genomskih abnormalnosti koje prate Mendelova pravila nasleđivanja rizik za rekurenciju je 50% za autozomno dominantne, a 25% za autozomno recesivne obrazce nasleđivanja (Chaix *et al.*, 2016). Međutim, varijabilna penetrantnost može da oteža procenu rizika za rekurenciju čak i

kod sindromskih USM. Stoga je za procenu rizika za rekurenciju neophodna detaljna analiza porodičnog stabla kao i poznavanje podataka iz literature (Hinton, 2008).

Imajući u vidu da su kod pacijenata sa USM zabeleženi svi tipovi nasleđivanja, istraživanja su pokazala da je empirijski rizik za rekurenciju za sve tipove USM od 1 do 4%, što ukazuje da većina USM ima multifaktorijalnu etiologiju (Gill *et al.*, 2003). Ipak, podaci iz literature pokazuju da se pojedine grupe embriološki povezanih USM češće nasleđuju kroz porodice i da je za pojedine USM kod rođaka prvog stepena srodstva rizik za rekurenciju od 3 do 80 puta veći u odnosu na opštu populaciju (Øyen *et al.*, 2009). Stopa heritabilnosti od 70 do 90 % ukazuje na visok genetički doprinos u etiologiji pojedinih grupa USM. Tri grupe USM sa najvećim relativnim rizikom za rekurenciju su: heterotaksija, RVOTO i LVOTO. Rizik za rekurenciju izolovanih USM varira u zavisnosti od tipa USM ali i od toga ko je od roditelja obeleio od USM (Pierpont *et al.*, 2018).

## 1.6. Detekcija genomskih abnormalnosti kod pacijenata sa urođenim srčanim manama

Najčešće primenjivana genetička testiranja kod pacijenata sa USM su: analiza kariotipa, fluorescentna *in situ* hibridizacija (engl., *Fluorescence in situ hybridization*, FISH), metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije (engl., *Multiplex ligation-dependent probe amplification*, MLPA), *hromozomski microarray* (engl., *Chromosomal microarray*) kao i sekvenciranje pojedinačnih gena i egzomska sekvenciranja bazirana na sekvenciranju naredne generacije (engl., *Next generation sequencing*, NGS) (Pierpont *et al.*, 2018; Chaix *et al.*, 2016; Geddes and Earing, 2018).

### 1.6.1 Kariotip

Analiza kariotipa je tradicionalna citogenetička analiza kojom mogu da se detektuju hromozomske aneuploidije kao i krupne strukturne hromozomske abnormalnosti (delecije, duplikacije, inverzije, translokacije) koje su vidljive svetlosnim mikroskopom. Analiza se zasniva na kultivaciji ćelija koje se dele (najčešće limfocita periferne krvi), preparaciji i bojenju hromozoma i njihovoj analizi na svetlosnom mikroskopu. Prednosti ove analize jesu niska cena, mogućnost detekcije balansiranih hromozomskih rearanžmana kao i mozaicizma. Glavno ograničenje ove analize jeste nizak nivo rezolucije jer se ovom analizom detektuju hromozomski rearanžmani koji su od 5-10 Mb (Yokoyama *et al.*, 2018). Stopa detekcije hromozomskih abnormalnosti analizom kariotipa kod pacijenata sa USM je oko 10%. Za detekciju submikroskopskih CNV (delecija i duplikacija) potrebno je primeniti neku od metoda molekularne citogenetike kao što su: FISH, MLPA analiza ili *hromozomski microarray* (Pierpont *et al.*, 2018).

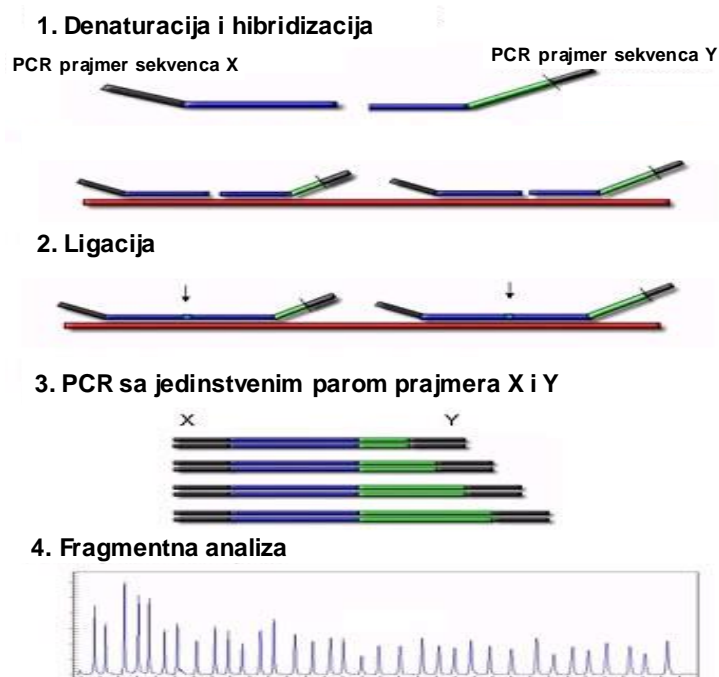
### 1.6.2. Fluorescentna *in situ* hibridizacija

FISH metoda se zasniva na primeni fluorescentno obeleženih DNK proba, u cilju analize odgovarajućih regiona na metafaznim hromozomima ili interfaznim jedrima (Brunet *et al.*, 2006). Primenjena proba hibridizuje sa ciljnom sekvencom ukoliko je ona prisutna, što se prepoznaje po prisustvu fluorescentnog signala u analiziranim mitozama. U slučaju prisustva delecije sekvence od interesa, signal na datom hromozomu nedostaje (Ratan *et al.*, 2017). Ova analiza se koristi kada postoji sumnja na abnormalnost tačno definisanog hromozomskog lokusa ili za verifikaciju rezultata dobijenih primenom hromozomskog *microarray*-a (Weise *et al.*, 2012). Prednost ove analize jeste mogućnost dobijanja informacija na nivou pojedinačnih ćelija što omogućava detekciju mozaicizma ali i mogućnost primene ove metode za detekciju kako balansiranih tako i kompleksnih rearanžmana (Mkrtchyan *et al.*, 2010) Glavno ograničenje FISH tehnike jeste da veličina lokus specifičnih proba ne može biti manja od 10 Kb (Liehr *et al.*, 1997). FISH metoda se obično primenjuje za detekciju pojedinačnih delecija i duplikacija. Najčešće se primenjuje za detekciju 22q11.2 mikroleucije i stopa detekcije ove delecije FISH analizom kod pacijenata sa USM je 12% (Zaidi and Brueckner, 2017).

### 1.6.3. Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije (MLPA)

MLPA analiza je semikvantitativna analiza za simultanu detekciju CNV (delecija i duplikacija) na velikom broju odabranih lokusa (čak do 60) u jednoj reakciji. Ova analiza se zasniva na lančanoj reakciji polimerizacije (engl., *polymerase chain reaction*, PCR), kapilarnoj elektroforezi i softverskoj obradi podataka (Stupia *et al.*, 2012).

Analiza započinje procesom denaturacije molekula DNK, nakon koga sledi hibridizacija proba sa sekvencama od interesa, ligacija hibridizacionih produkata i PCR amplifikacija hibridizovanih proba (Slika 2). Svaka MLPA proba se sastoji iz dva oligonukleotida, od kojih svaki nosi po jedno mesto za vezivanje prajmera, tako da se amplifikuju probe, a ne ispitivana DNK (Slika 2). PCR amplifikacija je moguća samo nakon uspešne hibridizacije oligonukleotidnih proba i uspešne ligacije, što zavisi od prisustva ciljne sekvence (Slika 2). Sve probe se amplifikuju uz pomoć istog para prajmera. Amplikoni se razlikuju po dužini, s obzirom da se sa strane jednog prajmera nalazi varijabilni region probe, čija se dužina povećava za po par nukleotida za svaku narednu probu (Slika 2). PCR produkti dužine 130-490 nukleotida se analiziraju kapilarnom elektroforezom na sekvenceru, a potom sledi analiza fragmenata uz pomoć odgovarajućeg softvera (Slika 2). Na osnovu poređenja ispitivanih sekvenci sa referentnim dobijaju se numerički i grafički prikazi relativne visine pikova. S obzirom da svaki pik odgovara jednoj amplifikovanoj probi odnosno njenoj ciljnoj sekvenci, smanjenje ili povećanje relativne visine pika za  $\geq 30X$  ukazuje na prisustvo delecije odnosno duplikacije ciljnog regiona (Jankowski *et al.*, 2008).



Slika 2. Princip MLPA analize. Objašnjenje dato u tekstu.

Preuzeto sa (<http://www.mlpa.com>, modifikovano).

Prednosti MLPA analize su brzina, ekonomičnost i visok procenat senzitivnosti i specifičnosti (Zanardo *et al.*, 2017). Ograničenja MLPA analize su nemogućnost detekcije hromozomskih rearanžmana na nivou jedne ćelije, visoka osetljivost na kontaminante uzoraka (znatno osetljivija metoda u odnosu na PCR) i nemogućnost detekcije balansiranih hromozomskih rearanžmana (Kazlowski *et al.*, 2008). Stopa detekcije CNV ovom analizom kod pacijenata sa USM iznosi od 3,2% do 29,3% u zavisnosti od selekcije pacijenata kao i od odabira komercijalno dostupnih MLPA kitova koji se primenjuju u testiranju (Sorensen *et al.* 2012; Monteiro *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2019, Mutlu *et al.* , 2018; Li *et al.*, 2018, Delea *et al.*, 2018 ).

Danas postoji veliki broj komercijalno dostupnih kitova koji sadrže probe za različite genomske lokuse i koji se koriste u dijagnostici velikog broja genetičkih bolesti. U objavljenim studijama koje su primenjivale MLPA analizu kod pacijenata sa USM najčešće su korišćeni kitovi P064 SALSA MLPA kit za najčešće mikrolelezione sindrome koji su praćeni srčanim defektima kao što su 22q11.2 delecioni sindrom, Williams-Bauren sindrom i 1p36. delecioni sindrom, P250 SALSA MLPA kit koji sadrži probe za 22q11.2 mikrolelecionni sindrom i probe za hromozomske lokuse koji se povezuju sa fenotipom koji je sličan 22q11.2 mikrolelecionnom sindromu, P311 SALSA MLPA kit koji sadrži probe komplementarne određenim egzonima u GATA4 genu, NKX2-5, CRELD i BMP4 genu u kojima se najčešće detektuju abnormalnosti kod pacijenata sa septalnim defektima kao i probe za hromozomske lokuse koji često povezivani sa USM (Monteiro *et al.*, 2017; Delea *et al.*, 2018; Mutlu *et al.*, 2018; Sorensen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018).

#### 1.6.4. Metoda molekularne kariotipizacije (hromozomski *microarray*)

Hromozomski *microarray* ili molekularni kariotip je metoda koja detektuje CNV duž čitavog genoma. Prema svom metodološkom principu razlikuju se dve grupe *array* analize: *array* baziran na komparativnoj genomskoj hibridizaciji (engl., *Comparative genomic hybridisation*, aCGH) i SNP (engl., *Single nucleotide polymorphism*) *array* (Rosenfeld and Patel, 2015).

aCGH se bazira na istovremenoj hibridizaciji testirane i kontrolne DNK, prethodno različito obeležene fluorescentnim bojama i pomešane u odnosu 1:1, sa probama koje se nalaze na posebno dizajniranim mikročipovima. Softverskim upoređivanjem jačine fluorescentnog signala testirane i kontrolne DNK, donosi se zaključak o prisutvu/odsustvu viška ili manjka genetičkog materijala, odnosno prisutvu duplikacija i delecija u testiranom uzorku (Levy and Burnside, 2019).

SNP *array* koristi mikročipove sa probama koje obuhvataju polimorfizme pojedinačnih nukleotida (SNP). Za razliku od aCGH metodologije, SNP *array* se bazira na hibridizaciji samo testirane DNK sa probama na primenjenom mikročipu. Poređenje fluorescentnog signala testiranog uzorka se radi u odnosu na referentni set, koji predstavlja normalizovane kontrolne uzorke, koji su analizirani odvojeno od testiranog uzorka (Schaaf *et al.*, 2011). Prednost primene SNP *array*-a jeste veća rezolucija kao i mogućnost identifikacije dugačkih regiona homozigotnosti koji između ostalog može da ukaže na prisustvo uniparentalne dizomije ili konsangviniteta (Weise *et al.*, 2012).

U svetu postoji nekoliko kompanija koje proizvode različite platforme i čipove sa različitom gustinom i različitom distribucijom proba duž genoma. Rezolucija pojedinih platformi dostiže red veličine od oko 0,7 Kb (Zanardo *et al.*, 2017). Glavna prednost *array* tehnologije jeste mogućnost detekcije CNV duž čitavog genoma u jednoj reakciji i veća rezolucija, odnosno mogućnost detekcije submikroskopskih rearanžmana koje se ne mogu detektovati analizom kariotipa. Nedostaci ove tehnologije jesu visoka cena, nemogućnost detektovanja balansiranih hromozomskih rearanžmana kao i nemogućnost detekcije niskog procenta mozaicizma (Edelmann *et al.*, 2009; Buno *et al.*, 2009).

Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku je preporučio primenu hromozomskog *microarray*-a kao test prvog izbora kod pacijenata sa intelektualnim poteškoćama, zaostajanjem u razvoju, poremećajima iz spektra autizma i multiplim anomalijama (South *et al.*, 2013). Brojne studije ukazuju da se ova analiza može primeniti i kod pacijenata sa USM (Molck *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2008; Shanshen *et al.*, 2018; Geng *et al.*, 2014; Syrmou *et al.*, 2013). Rezultati ovih studija pokazuju da je stopa detekcije CNV kod pacijenata sa USM od 4,37% do 67,3% (Geng *et al.*, 2014; Syrmou *et al.*, 2013). U razvijenim zemljama hromozomski *microarray* se primenjuje kod pacijenata sa USM kao test prvog izbora. U zemljama sa ograničenim resursima, se kao test prvog izbora koriste alternativne analize među kojima MLPA analiza može biti dobar izbor (Zanardo *et al.*, 2017).



### 1.6.5. Sekvenciranje pojedinačnih gena po Sangeru

Sekvenciranje DNK predstavlja utvrđivanje redosleda nukleotida u molekulu DNK. Metode za očitavanje sekvence DNK su automatizovane i izvode se u aparatima koji su nazvani automatski sekvenatori (Rizzo and Buck, 2012). Sekvenciranje po Sangeru je tradicionalna metoda koja predstavlja zlatni standard za iščitavanje genskih sekvenci, kojom se dobijaju najtačnije informacije o genskoj sekvenci. Tehnologija koja se koristi u ovom pristupu se danas često naziva „prva generacija sekvenciranja“, a bazira se na reakciji terminacije sinteze lanaca primenom fluorescentno obeleženih dideoziribonukleozid tri fosfata (ddNTP). Nakon ove reakcije za čije odvijanje je neophodan PCR aparat, slede separacija fragmenata kapilarnom elektroforezom i laserska detekcija signala koji se odvijaju u sekvenatoru. Softverskom obradom podataka donosi se zaključak o prisustvu/odsustvu abnormalnosti u analiziranim sekvencama (Pavićević Savić and Matić, 2011). Ovom metodom se mogu detektovati različite genske mutacije kao što su tačkaste mutacije, male insercije i delecije. Glavno ograničenje ove analize jeste to što se njom mogu iščitavati kratki DNK fragmenti veličine do 1 Kb (Rizzo and Buck, 2012). Kod pacijenata sa USM, sekvenciranje pojedinačnih gena po Sangeru se primenjuje kada postoji jasna klinička sumnja na abnormalnost određenog gena (Jerves *et al.*, 2020).

### 1.6.6. Sekvenciranja gena primenom tehnologije naredne generacije sekvenciranja

Nova generacija metoda za sekvenciranje omogućava istovremenu analizu velikog broja gena, te se ova metodologija često označava i kao masivno, paralelno ili duboko sekvenciranje (Behjati and Tarpey, 2013). Ovakav pristup u iščitavanju genoma omogućen je razvojem NGS platformi koje se zasnivaju na različitim tehnologijama sekvenciranja. Bez obzira na njihov različit tehnološki pristup, sve NGS platforme se zasnivaju na ideji o paralelnom sekvenciranju velikog broja gena, a potom i bioinformatičkom povezivanju dobijenih podataka. Ova tehnologija ne bi bila moguća bez razvijene tehničke i bioinformatičke podrške (Rizzo and Buck, 2012). Osnovne tri faze svake analize bazirane na primeni NGS tehnologije su:

- priprema DNK uzorka odnosno kreiranje biblioteke tj. templejta za sekvenciranje
- reakcija sekvenciranja i detekcija informacija dobijenih ovim procesom
- bioinformatička obrada podataka.

Istovremenim sekvenciranjem velikog broja gena se dobija obilje genetičkih informacija, čija se obrada pokazala kao veliki izazov u ovoj tehnologiji. Svaki nukleotid se sekvencira više puta, što se označava kao dubina pokrivenosti sekvence, što doprinosi tačnosti rezultata (Behjati and Tarpey, 2013).

NGS tehnologija je našla praktičnu primenu kako za detekciju već poznatih genskih varijanti za koje se zna da uzrokuju različite bolesti, tako i za otkriće novih genskih varijanti čije otkriće doprinosi rasvetljenju molekularnih osnova bolesti. Sa druge strane, primena analiza koje su bazirane na NGS tehnologiji u kliničkoj praksi doprinosi i mogućnosti za detekciju uzgrednih

nalaza, tj. detekciji patogenih varijanti koje se ne odnose na dijagnozu, zbog koje je analiza indikovana. Ove varijante mogu biti od značaja ako se detektuju u presimptomatskom periodu, jer mogu da doprinesu prevenciji morbiditeta i mortaliteta. Američki koledž za medicinsku genetiku i genomiku je predložio listu od 73 gena za koje se preporučuje izveštavanje, ako se u njima detektuju varijante (Miller *et al.*, 2021).

U kliničkoj praksi se primenjuju različiti modaliteti NGS tehnologije kao što su: genski paneli, sekvenciranje „kliničkog egzoma“, sekvenciranje celog egzoma i sekvenciranje celog genoma (Sun *et al.*, 2015).

Genski paneli se primenjuju za detekciju genskih varijanti lokusno heterogenih bolesti. Prednost primene ovakvog pristupa jeste mogućnost analize definisanih gena čije su sekvence visoko pokrivene primenjenom platformom, uz smanjenu verovatnoću detekcije uzgrednih nalaza. Analiza ograničenog broja gena doprinosi jednostavnijoj bionformatičkoj obradi podataka, a visoka pokrivenost sekvenci od interesa rezultuje nižoj stopi lažno pozitivnih rezultata (Bean *et al.*, 2019).

U želji da se jednim testom odgovori na raznolike zahteve kliničke prakse, kreirani su genski paneli koji obuhvataju oko 5000 gena za koje je dokazano da učestvuju u nastanku različitih, pre svega monogenских bolesti. Zbog svoje kliničke i genetičke relevantnosti, paneli u kojima se ispituju kodirajući regioni ovih gena su nazvani „klinički egzom“ ili „Mendeliom (Pajusalu *et al.* 2018). Za ovu analizu se najčešće koristi *TruSight One Site Sequencing* kit čija prva verzija obuhvata analizu 4813 gena, dok proširena verzija ovog kita (*TruSight One Site Sequencing expanded*) pruža mogućnost analize preko 6000 gena (Pengelly *et al.*, 2018; Naterade Benito *et al.*, 2021). Na osnovu kliničke slike pacijenta, kreiraju se specifični setovi gena koji se detaljno analiziraju. Odabir gena za analizu se najčešće radi u skladu sa HPO bazom (Human Phenotype Ontology) u kojoj su različite kliničke manifestacije asocirane sa grupom gena koji ih uzrokuju. Stoga je za primenu ove analize od velikog značaja detaljan klinički izveštaj lekara (Robinson and Mundlos, 2010). Prednosti primene kliničko egzomskog sekvenciranja su: povoljna cena, jednostavnija bioinformatička obrada podataka, kao i niža stopa detekcija uzgrednih nalaza (Pajusalu *et al.*, 2018).

Sekvenciranje celog egzoma podrazumeva iščitavanje sekvenci svih egzona kao i graničnih sekvenci između egzona i introna. Ovim pristupom se dobija informacija o kodirajućem delu genoma koji čini oko 2% celokupnog genoma.

Sekvenciranje celog genoma uključuje analizu kako protein kodirajućih tako i nekodirajućih regiona genoma (Kumar *et al.*, 2019). Pored varijanti u okviru egzona, ovim testiranjem je moguće detektovati i varijante u okviru introna, gena za nekodirajuće RNK kao i varijante u okviru mitohondrijalnog genoma (Lionel *et al.*, 2018).

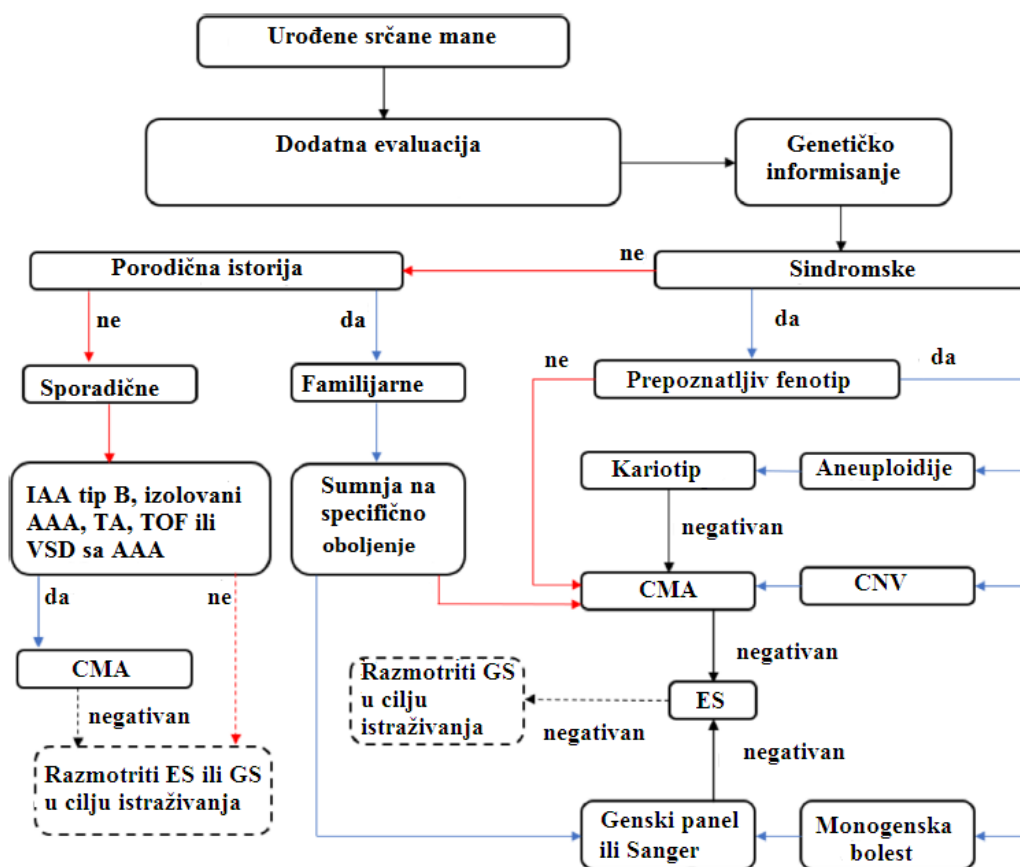
## 1.7. Odabir genetičkog testa

Pri donošenju odluke o sprovođenju genetičkog testiranja i odabiru adekvatnog genetičkog testa kod pacijenata sa USM neophodno je imati u vidu informacije o tipu prisutne srčane mane, prisustvu ekstrakardijalnih malformacija kao i podatke o porodičnoj i prenatalnoj istoriji (Pierpont *et al.*, 2018). Klinička evaluacija pacijenata sa USM je često multidisciplinarna i uključuje stručnjake iz različitih oblasti. Pored detaljnih kardioloških pregleda kojima se definiše tip prisutne srčane mane, kod ovih pacijenata se beleže podaci o rastu, prisustvu facijalne dismorfije (anomalije oka, uva, usta i nosa), abnormalnosti ekstremiteta (dužina, atrofija), anomalija šaka i stopala (polidaktilija, kratki prsti, klinodaktilija) i drugih skeletnih abnormalnosti, abnormalnosti mozga i centralnog nervnog sistema, anomalije drugih organskih sistema, kao i procena intelektualnih sposobnosti, neurološkog i motornog statusa (Chaix *et al.*, 2016).

Imajući u vidu heterogenu genetičku osnovu USM, poslednjih godina se dosta radi na objavljivanju podataka o adekvatnoj primeni genetičkih testova kod ove grupe pacijenata. U literaturi se mogu naći najmanje dva vodiča sa preporukama o primeni genetičkih testova kod pacijenata sa USM, kao i više predloženih algoritama iz različitih centara (Jerves *et al.*, 2020).

Prema najnovijim preporukama Američkog udruženja za kardiologiju (engl. *American Heart Association*, AHA) iz 2018. god. testiranje na prisustvo mikrodelecije u regionu 22q11.2 treba sprovesti kod svih novorođenčadi/dece/adolescenata/odraslih sa prekidom aortnog luka, zajedničkim trunkusom, TOF, izolovanih anomalija aortnog luka kao i kod pacijenata sa USM i dodatnim znacima koji upućuju na 22q11.2 mikrodelecioni sindrom. Prema preporukama ovog udruženja, kod svih pacijenata sa supravulvularnom aortnom stenozom treba razmotriti testiranje na Williams sindrom u trenutku postavljanja dijagnoze USM. Ovo testiranje treba razmotriti i u slučaju postojanja periferne stenozne pulmonarne arterije posle odojačkog perioda, kao i u slučaju bilo kog defekta koji je povezan sa elastinskom arteriopatijom, uključujući ostijalnu stenozu koronarne arterije, stenozu renalnih arterija detektovanih u bilo kom uzrastu. Takođe prema AHA preporukama kod svih pacijenata sa heterotaksjom treba sprovesti hromozomski *microarray* i analizu *ZIC3* gena (ova naliza se naročito preporučuje kod pacijenata muškog pola) (Pierpont *et al.*, 2018).

Jerves i saradnici su 2019. godine objavili algoritam za odabir genetičkih testova kod pacijenata sa USM (Slika 3). Ovaj algoritam je baziran na prethodno objavljenim iskustvima iz različitih centara, a kreiran je u skladu sa novim saznanjima o dostupnoj tehnologiji. Prema ovom algoritmu prvi korak u odabiru odgovarajućeg genetičkog testa jeste razdvajanje sindromskih od nesindromskih USM. Sindromske USM sa ekstrakardijalnim malformacijama čine oko 30% svih USM, a kod njih je verovatnoća za postavljanje genetičke dijagnoze oko 50%. Takođe, genetička dijagnoza se može postaviti kod oko 30-45% izolovanih familijarnih USM i kod oko 20% izolovanih sporadičnih USM. Ukoliko klinička slika pacijenata jasno upućuje na prepoznatljiv fenotip nekog od sindroma uzrokovanih hromozomskim aneuploidijama (hromozoma 13, 18, 21, X) preporučuje se analiza kariotipa. Sa druge strane, ako je klinička slika pacijenata takva da ne upućuje na određni sindrom, test izbora kod ovih pacijenata je hromozomski *microarray*. U kasnijim fazama testiranja, u slučaju dobijanja negativnih rezultata prethodno sprovedenih testiranja preporučuje se primena egzomskog sekveniranja, genskih panela ili sekvenciranja po Sangeru (Jerves *et al.*, 2020).



Slika 3. Algoritam za primenu genetičkih testiranja kod pacijenata sa USM. Preuzeto od (Jerves *et al.*, 2020, modifikovano). CMA-hromozomski *microarray*; ES-sekvenciranje celog egzoma; GS-sekvenciranje celog genoma. IAA tip B-prekid aortnog luka tip B; AAA-anomalija aortnog luka; TA-trunkus arteriozus; TOF-tetralogija *Fallot*; VSD- ventrikularni septalni defekt.

## 1.8. Značaj genetičkih testiranja za pacijente sa urođenim srčanim manama

Sprovođenje genetičkih testiranja kod pacijenata sa USM može biti od značaja za postavljanje precizne dijagnoze, bolju procenu prognoze, procenu rizika za rekurenciju, genetičko informisanje porodica i prenatalnu dijagnostiku (Ito *et al.*, 2017).

Postavljane precizne dijagnoze doprinosi adekvatnom lečenju pacijenata i spoznavanje molekularnih mehanizama nastanka bolesti. Takođe, pacijenti sa USM često imaju kardiološke i nekardiološke komorbiditete koji mogu da utiču na lečenje i kvalitet njihovog života. Ove osobe

su u riziku za razvoj aritmija, miokardnih disfunkcija i respiratornih komplikacija (Pierpont *et al.*, 2018). Dodatno, kod pacijenata sa USM se često javljaju i neurorazvojne poteškoće (Blue *et al.*, 2018; Steurer *et al.*, 2018). Prevalenca neurorazvojnih poteškoća kod pacijenata sa USM varira i kreće se od 20% kod pacijenata sa blagim USM pa sve do 50% kod pacijenata sa teškim USM (Zaidi and Brueckner., 2017). Spektar neurorazvojnih abnormalnosti koji se javljaju kod ovih pacijenata su: intelektualne poteškoće, problemi sa govorom, poremećaji iz spektra autizma, poremećaj u neverbalnim i motornim veštinama. Prevalenca razvoja deficita pažnje i poremećaja hiperaktivnosti (engl., *Attention Deficit Hyperactivity Disorder*, ADHD) kod pacijenata sa USM je 3-4 puta veća u odnosu na opštu populaciju. Pretpostavlja se da ne postoji ni jedan dominantni faktor koji doprinosi pojavi neurorazvojnih poremećaja kod pacijenata sa USM, te je stoga teško proceniti koja grupa pacijenata je u riziku za nastanak ovog komorbiditeta (Blue *et al.*, 2018; Steurer *et al.*, 2018). Podaci iz literature ukazuju da su neurorazvojni poremećaji češći kod pacijenata sa postavljenom dijagnozom genetičkog sindroma. Stoga primena genetičkih testova može da doprinese ranom započinjanju razvojnih stimulacija i rehabilitacija (Simmons and Brueckner, 2017).

Genetička testiranja mogu da utiču na tok lečenja pacijenata i procenu prognoze. Generalno, poznato je da pacijenti kod kojih se utvrdi prisustvo patogenih CNV imaju lošiju prognozu u odnosu na one pacijente kod kojih nisu detektovane ove varijante. Na primer, kod pacijenata kod kojih se utvrdi prisustvo mikrodelecije 22q11.2 treba planirati primenu ozračenih derivata krvi i odložiti primenu živih vakcina do normalizacije ćelijskog imuniteta, a pacijenti sa postavljenom dijagnozom Williams sindroma imaju veću sklonost za komplikacije nastaline kao posledica anestezije, uključujući i rizik za iznenadnu smrt (Zaidi and Brueckner, 2017).

Genetičko informisanje pacijenata/porodica obolelih treba sprovoditi kako pre primene genetičkih testiranja tako i nakon urađenih genetičkih testova (Chaix *et al.*, 2016). Genetičko informisanje pre primene testiranja ima za cilj da uputi obolele/porodicu obolelih o mogućnostima predloženog genetičkog testa. Ovo informisanje je naročito važno u slučaju primene egzomskog sekvenciranja s obzirom da ovim testiranjem pored uzročnih varijanti mogu da se detektuju i uzgredni nalazi. Genetičko informisanje posle primene testiranja ima za cilj tumačenje rezultata sprovedenog genetičkog testiranja kao i pružanje informacija o značaju detektovanih varijanti kako za pacijenta tako i za njegovu porodicu uz pružanje informacija o riziku za rekurenciju i mogućnostima za prenatalnu dijagnostiku (Resa *et al.*, 2006).

Novorođenčad sa kritično teškim USM predstavlja 25-30% hospitalizovanih pacijenata na odeljenjima intenzivne nege (Miranovic, 2016). Stopa smrtnosti kod ovih pacijenata je visoka, te je pravovremeno postavljanje precizne dijagnoze, od izuzetnog značaja. Genetička testiranja mogu da olakšaju ovaj proces, ali nažalost zbog visokih troškova često nisu dostupna svim pacijentima. Stoga, sprovođenje istraživanja koja imaju za cilj detekciju i karakterizaciju genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritičnim USM može da doprinese uvođenju novih algoritama za primenu genetičkih testiranja i unapređenju dijagnostike i lečenja.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrditi učestalosti submikroskopskih genomskih abnormalnosti primenom MLPA analize, *hromozomskog microarray-a* i sekvenciranja „kliničkog egzoma“ kod novorođenčadi sa kritično teškim USM hospitalizovane na Odeljenju intenzivne nege.
2. Analizirati distribuciju učestalosti pojedinih tipova srčanih mana i nekardijalnih malformacija među ispitanicima sa pozitivnim rezultatima primenjenih genetičkih testova u cilju utvrđivanja povezanosti određenih fenotipova sa postojanjem patogenih hromozomskih/genskih varijanti.
3. Utvrditi stopu detekcije CNV MLPA analizom u cilju procene da li ova analiza može da se primenjuje kao test prvog izbora kod novorođenčadi sa kritično teškim USM koja su hospitalizovana na odeljenjima intenzivne nege.

## 3. ISPITANICI, MATERIJAL I METODE

### 3.1. Ispitanici

Ovo istraživanje je obuhvatilo 100 uzastopnih neselektovanih pacijenata novorođenačkog uzrsta sa kritično teškim USM (kompleksne ili kombinovane srčane mane) hospitalizovanih na Odeljenju intenzivne nege, Univerzitetske dečje klinike u Beogradu u periodu od avgusta 2014. do septembra 2019. godine. Pacijenti sa kliničkom slikom vijabilnih trizomija (21, 18, 13) nisu uključeni u studiju.

Roditelji/staratelji svih pacijenata su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji. Sprovođenje ovog istraživanja je odobreno od strane Etičkog odbora Univerzitetske dečje klinike (broj odluke: 017/626/188; 10.10.2014. godine) kao i Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj odluke: 1550/V-7; 31.05.2019. godine).

### 3.2. Dizajn studije

Pre primene genetičkih testiranja za svakog ispitanika je obavljena klinička evaluacija, pri čemu su zabeleženi sledeći demografski i klinički značajni podaci:

- datum rođenja
- pol
- tip srčane mane
- prisustvo/odsustvo ekstrakardijalnih malformacija
- prisustvo/odsustvo minor facijalnih dismorfizama
- prisustvo/odsustvo pozitivne porodične istorije
- prisustvo/odsustvo pozitivne prenatalne anamneze kao i informacije o dejstvu teratogena

Dijagnoza srčane mane je postavljena na osnovu ehokardiografije. Svi ispitanici su prema tipu srčane mane klasifikovani prema klasifikaciji Bottoa i saradnika (Botto *et al.*, 2007) u sledeće grupe:

1. konotrunkalne USM
2. anomalni utok plućnih vena
3. LVOTO
4. RVOTO
5. septalni defekti
6. heterotaksija
7. jednokomorno srce /kompleksne USM
8. septalni defekti + LVOTO

9. septalni defekti+RVOTO
10. druge asocijacije

Prisustvo ekstrakardijalne malformacije podrazumevalo je prisustvo najmanje jedne major malformacije drugih organskih sistema. U anomalije skeletnog sistema su pored major mana zabeleženi podaci o polidaktiliji, dok je u major anomalije urogenitalnog sistema uključeno i prisustvo nespuštenih testisa.

Svakom ispitaniku je urađena MLPA analiza za najčešće hromozomske lokuse koji se dovode u vezu sa nastankaom USM. Potom, za ispitanike za negativnim nalazom MLPA testiranja čiji su roditelji bili saglasni za nastavak istraživanja, urađena su dodatna testiranja. U prvom koraku nastavka istraživanja urađena je analiza hromozomski *microarray*, a u slučaju dobijenog negativnog rezultata, urađena je analiza sekvenciranje „kliničkog egzoma“.

Genetička testiranja (MLPA, hromozomski *microarray*, sekvenciranje ciljanih gena po Sangeru) su rađena i kod roditelja pacijenata koji su bili zainteresovani za sprovođenje istih, a sa ciljem utvrđivanja statusa nosioca i porekla prethodno detektovane varijante (nasleđena ili *de novo*) kod deteta.

MLPA analiza je rađena u Institutu za neurologiju Kliničkog centra Srbije i u Univerziteskoj dečjoj klinici u Beogradu. Za određeni broj ispitanika hromozomski *microarray* je urađen u Institutu za humanu genetiku, Medicinskog fakulteta u Beogradu, a za ostale ispitanike u laboratoriji *qGenomics* u Barseloni. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ je rađeno u Centru za Mendelovsku genomiku pri Kliničkom institutu za medicinsku genetiku u Ljubljani.

Nakon pristizanja rezultata sprovedenih genetičkih testiranja obavljeno je genetičko informisanje roditelja koji su bili zainteresovani, pri čemu su tada prikupljeni podaci o eventualno nastalim smrtnim ishodom ispitanika (detektovanih tokom prve godine života).

### 3.3. Biološki materijal

Za potrebe MLPA analize, hromozomskog *microarray-a* i kliničkog egzomskog sekvenciranja, svakom ispitaniku je uzeto po 3,5 ml periferne krvi sa 0,38% Na-citratom kao antikoagulansom. Prikupljeni materijal je čuvan u zamrzivaču do momenta izolacije DNK.

Genomska DNK ispitanika izolovana je iz uzoraka periferne krvi metodom isoljavanja po Milleru (Miller *et al.*, 1988) ili primenom kita za ekstrakciju DNK iz krvi, tkiva i telesnih tečnosti (*PureLink Genomic DNA Kits, Invitrogen*, kat. br. K1820-01, K1820-02, K1821-04) uz upotrebu kolona.



## 3.4. Metode

### 3.4.1. Izolacija DNK metodom isoljavanja po Milleru

Izolacija DNK metodom isoljavanja je bazirana na osobini proteina da se talože u rastvorima sa visokim koncentracijama soli. Izolacija je rađena iz 2,5 ml krvi ispitanika pomešane sa 0,38% Na-citratom kao antikoagulansom u odnosu 1:9.

U prvom koraku izolacije, uzorci krvi ispitanika su pomešani sa jednakim volumenom pufera za lizu (0,32 M saharoza, 10 mM TRIS HCl, 1% triton, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), a potom je smeša inkubirana 20 minuta na +4°C. Nakon inkubacije, smeša je centrifugirana 15 minuta na 2000 obrtaja, čime su odvojeni leukociti u vidu precipitata. Supernatant je odbačen, a talog resuspendovan sa 5 ml fiziološkog pufera (0,075 M NaCl, 0,025 M EDTA pH8). Postupak centrifugiranja i resuspendovanja je ponovljen 3 puta. Nakon završenog trećeg centrifugiranja supernatant je odbačen, a u epruvetu sa talogom je dodato 1,5 ml pufera A (10 mM TRIS HCl, 400 ml NaCl, 2 mM EDTA), 25 µl 10% proteinaze K i 50 µl 10% SDS (Na-dodecisulfat). Talog je resuspendovan i smeša je inkubirana preko noći na 37°C. Narednog dana u epruvetu je dodato 0,5 ml 6 M NaCl, smeša je promešana, a potom centrifugirana 15 minuta na 3000 obrtaja. Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u čistu epruvetu i centrifugiran 15 minuta na 4000 obrtaja. Potom je supernatant prebačen u graduisanu epruvetu u koju je zatim doliven isti volumen izopropanola. Nakon mešanja, u uzorku je uočen končić DNK bele boje, koji je namotan na stakleni štapić i potopljen 30 sekundi u 70% etanol. DNK je osušena na sobnoj temperaturi, a potom rastvorena u 150 µl redestilovane vode.

### 3.4.2. Izolacija DNK primenom kita za ekstrakciju DNK uz upotrebu kolona

Za izolovanje DNK iz limfocita periferne venske krvi uz upotrebu kolona korišćen je komercijalni kit *PureLink<sup>R</sup> Genomic DNA Kits (Invitrogen)*. Izolacija je rađena iz 200 µL krvi po protokolu proizvođača. U epruvete je sipano 200µL krvi, a potom dodato 20 µL proteinaze K i 20 µL RNaze A. Smeša je kratko izmešana pomoću vorteksa i inkubirana 2 minuta na sobnoj temperaturi. Potom je u smešu dodato 200 µL pufera za lizu (*PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer*). Nakon toga je usledilo kratko mešanje smeše pomoću vorteksa dok nije dobijena homogena struktura, a onda i inkubacija smeše na 55°C u trajanju od 10 minuta. Potom je u lizat dodato 200 µL 96-100% etanola. Lizat je promešan na vorteksu do dobijanja homogene strukture, a zatim prebačen na prethodno sklopljenu kolonu. Kolona je centrifugirana 1 minut na 10000xg. Pri svakom centrifugiranju epruveta od 2 mL u kojoj je sakupljen supernatant je odbačena, a kolona je prenet na novu epruvetu. Nakon zamene epruvete, na kolonu je naneto 500 µL pufera za ispiranje I (*Wash buffer I*). Ponovljeno je centrifugiranje u trajanju od 1 minuta na 10000xg. Nakon odlivanja supernatanta usledilo je dodavanje 500 µL pufera za ispiranje II (*Wash buffer II*) i centrifugiranje u trajanju od 3 minuta na 12000xg. Kolona je dodatno centrifugirana 1 minut da bi se obezbedilo potpuno uklanjanje pufera. Po završenom procesu

centrifugiranja, kolona je prebačena u novu epruvetu i na nju je naneto 25 µL redestilovane vode. Ovako pripremljena kolona prvo je inkubirana na sobnoj temperaturi 1 minut, a zatim centrifugirana 1 minut na 8000xg. Na ovaj način je dobijena izolovana DNK rastvorena u redestilovanoj vodi.

### 3.4.3. Određivanje koncentracije i kvaliteta izolovane genomske DNK

Kvantifikacija DNK uzoraka je rađena metodom spektrofotometrije na *BioPhotometru* (Eppendorf, Nemačka). Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije DNK molekula se zasniva na osobini molekula DNK da apsorbuje svetlost talasne dužine 260 nm, pri čemu je intenzitet apsorbovane svetlosti direktno proporcionalan koncentraciji DNK. Primenom spektrofotometrije moguće je odrediti i koncentraciju proteina, soli i drugih molekula koji se nalaze u rastvoru DNK, a koji utiču na čistoću DNK izolata. Proteini apsorbuju maksimum svetlosti na 280 nm, dok soli apsorbuju maksimum svetlosti na 230nm. DNK uzorak je dobrog kvaliteta ako je odnos vrednosti absorbanci  $A_{260}/A_{280}$  između 1,65 i 1,75, dok odnos absorbanci  $A_{260}/A_{230}$  treba da bude oko 2 (Marković *et al.*, 2006).

U cilju određivanja koncentracije i kvaliteta izolovanih DNK napravljeno je 60 µl 10% razblaženja DNK (6 µl uzorka DNK i 54 µl redestilovane vode). Potom je izvršena priprema i kalibracija Biophotometra za merenje koncentracije uzorka, pri čemu je kao „blank“ uzorak korišćena redestilovana voda. Nakon toga, u kivete je naneto 60 µl razblaženja ispitivanih uzoraka DNK. Sa aparata su očitane koncentracije ispitivanih DNK uzoraka kao i vrednosti  $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{230}$ .

### 3.4.4. Metoda višestrukog umnožavanja proba zavisnog od ligacije

Detekcija najčešćih CNV koji se dovode u vezu sa nastankom USM kod je rađena MLPA analizom primenom dva kita *P311 Salsa MLPA probe mix* (MRC Holland) i *P250 Salsa MLPA probemix* (MRC Holland) prema uputstvu proizvođača.

*P311 Salsa MLPA probemix* sadrži probe za sledeće regione: 7 egzona *GATA4* gena, 2 egzona *NKX2-5* gena, 2 egzona *TBX5* gena, 4 egzona *BMP4* gena, 12 egzona *CRELD1* gena, 22q11.2, 5q31,12p13, 17q23, 2p24, 6p12, 2q37, 7p14, 4q22, 1p13 i 18p11 region.

*P250 Salsa MLPA probemix* sadrži 29 proba za 22q11.2 region kao i probe za: 4p, 8p, 9q, 10p, 17p i 22q13 region.

MLPA analiza obuhvata sledeće faze: denaturaciju DNK molekula, reakciju hibridizacije proba sa sekvencama od interesa, reakciju ligacije, PCR reakciju, razdvajanje fragmenata kapilarnom elektroforezom i softversku obradu podataka. MLPA reakcija je rađena u PCR mašini *Veriti* (*Life Sciences*, SAD) po sledećem programu:

1. Denaturacija DNK
  - 98°C 5 minuta
  - 25°C pauza
2. Reakcija hibridizacije
  - 95°C 1 minut
  - 60°C pauza
3. Reakcija ligacije
  - 54°C pauza
  - 54°C 15 minuta
  - 98°C 5 minuta
  - 20°C pauza
4. PCR reakcija
  - 35 ciklusa:
    - 95°C 30 sekundi
    - 60°C 30 sekundi
    - 72°C 60 sekundi

Za izvođenje procesa denaturacije DNK u tube od 0,2 ml je rastvoreno po 100 ng DNK u 5 µl redestilovane vode. Tube su ubačene u PCR aparat i pokrenut je program za MLPA reakciju. Nakon završene denaturacije i hlađenja uzoraka na 25°C u svaki uzorak je dodato po 3 µl prethodno pripremljene hibridizacione smeše (1,5 µl MLPA pufera i 1,5 µl smeše proba, *MRC Holland*) i pokrenut je nastavak MLPA programa za reakciju hibridizacije. Inkubacija uzoraka na 60°C u PCR aparatu je trajala od 16 do 20 sati (preko noći). Narednog dana započeta je reakcija ligacije. Pokrenut je program za nastavak MLPA reakcije. U trenutku uspostavljanja temperature od 54°C, dok su uzorci bili u PCR aparatu dodato je po 32 µl ligacione smeše (25µl redestilovane vode, 3µl ligacionog pufera A, 3µl ligacionog pufera B, 1 µl Ligase-65 enzima, *MRC Holland*). Nakon dodavanja ligacione smeše, pokrenut je nastavak MLPA programa za reakciju ligacije. Po hlađenju uzoraka na 20°C, uzorci su izvađeni iz PCR aparata i u svaki je na sobnoj temperaturi naliveno po 10 µl PCR smeše (7,5 µl redestilovane vode, 2 µl SALSA PCR smeše prajmera (oligonukleotidi od kojih je jedan fluorescentno obeležen FAM) i 0,5 µl SALSA polimeraze (*MRC Holland*)). Potom su uzorci vraćeni u PCR mašinu i pokrenut je nastavak MLPA programa za PCR reakciju.

Nakon završene MLPA reakcije, usledila je priprema uzoraka za kapilarnu gel elektroforezu. Napravljena je smeša koja sadrži: 0,7µl produkta MLPA reakcije, 0,3 µl standarda za veličinu (*GeneScan™-500 LIZ, Life Technologies, Applied Biosystems, SAD*) u odnosu na koji se određuje dužina analiziranih fragmenata i 9 µl formamida (*HiDi Formamide, Life Technologies, Applied Biosystems, SAD*). Pripremljena smeša je denaturisana na 80°C u trajanju od 2 minuta, a potom ohlađena na 4°C u PCR aparatu. Kapilarna elektroforeza je rađena na sekvenatoru *ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, Applied Biosystems, SAD)*. Injekciono vreme je iznosilo 15 sekundi, injekciona voltaža 1,6 kV, voltaža elektroforeze 10 kV, a trajanje elektroforeze je iznosilo 3 000 sekundi.

Obrada podataka je rađena primenom *Coffalyser.Net* softvera (*MRC-Holland*). Po tri uzorka su označeni kao referentni, a to su po pravilu bili uzorci zdravih osoba koje nemaju USM niti bilo kakve druge urođene anomalije. Referentni uzorci služe da bi se u odnosu na njih merila odstupanja u visini pikova ispitivanih uzoraka. Rezultati su interpretirani kao normalni kada su

vrednosti odnosa relativne visine pika poreklom od probe u testiranom uzorku i visine pika odgovarajuće probe u kontrolnom uzorku iznosile od 0,80 do 1,2. Vrednosti relativnog odnosa od 0,4 do 0,65 su ukazivale na prisustvo delecije dok su vrednosti relativnog odnosa od 1,3 do 1,65 ukazivale na prisustvo duplikacije u analiziranim regionima.

### 3.4.5. Hromozomski *microarray*

Hromozomski *microarray* je rađen primenom aCGH tehnologije, upotrebom oligonukleotidnog mikročipa (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Kalifornija, SAD) koji sadrži oko 60,000 proba raspoređenih po celom genomu. Probe koje se nalaze u okviru primenjenog mikročipa su specifične za pericentromerne, telomerne i euhromatinske delove genoma. S obzirom da je prosečna gustina proba 35 Kb, a prosečna pokrivenost izvan targetnih regiona 125 Kb, primenom navedenog metodološkog pristupa je omogućena detekcija CNV većih od 350 Kb. Proces izvođenja analize obuhvata sledeće faze:

- digestiju DNK
- obeležavanje kontrolnog i testiranog uzorka različitim bojama
- prečišćavanje obeležene DNK
- proces hibridizacije kontrolnog i testiranog uzorka sa probama na mikročipu
- ispiranje mikročipa
- skeniranje mikročipa
- obradu podataka.

Priprema uzoraka i mikročipa za analizu je rađena primenom *SureTag Complete DNA Labeling* kita (*Agilent*). Digestija testirane i kontrolne DNK je urađena po sledećoj proceduri. U jednu tubu je dodato 500 ng DNK ispitanika, dok je u drugu tubu dodato 500 ng DNK kontrole. U obe tube je nalivena *milliQ nuclease-free* voda do ukupnog volumena od 11,1  $\mu$ l. Zatim je u svaku tubu dodato po 1,9  $\mu$ l reakcione smeše za digestiju (1,4  $\mu$ l smeše za digestiju, 0,25  $\mu$ l *AluI* (10U/  $\mu$ l), 0,25  $\mu$ l *RSA I* (10 U/  $\mu$ l) (*Agilent*)). Nakon mešanja, tube su inkubirane najpre 2 h na 37°C, a potom 20 minuta na 65°C kako bi se izvršila inaktivacija enzima. Potom su tube sa uzorcima prebačene na led. Ovim postupkom je završen proces digestije koji je omogućio dobijanje fragmenata testirane i kontrolne DNK dužine od 200-500 bp. U cilju obeležavanja uzoraka u svaku tubu je dodato po 2,5  $\mu$ l *Random Primer 2.5* rastvora (*Agilent*). Nakon mešanja, smeša je inkubirana 3 minuta na 98°C, a potom je usledila inkubacija na ledu u trajanju od 5 minuta. U tube je potom dodata prethodno pripremljena reakciona smeša za obeležavanje (smeša za tubu sa testiranim uzorkom: 2  $\mu$ l vode bez nukleaza, 5  $\mu$ l reakcionog pufera, 2  $\mu$ l dNTP, 1,5  $\mu$ l Cy5 i 0,5  $\mu$ l *Exo-Klenow* fragmenta (*Agilent*); smeša za tubu sa kontrolnim uzorkom: 2  $\mu$ l vode bez nukleaza, 5  $\mu$ l reakcionog pufera, 2  $\mu$ l dNTP, 1,5  $\mu$ l Cy3 i 0,5  $\mu$ l *Exo-Klenow* fragmenta (*Agilent*)). Nakon mešanja tube su inkubirane 2 h na 37°C. Proces obeležavanja DNK uzoraka je završen dodatnom inkubacijom uzoraka na 65°C u trajanju od 20 minuta. Uzorci su dalje prečišćeni po sledećoj proceduri. U svaku tubu je dodato po 430  $\mu$ l 1xTE (*Agilent*), a potom su smeše prebačene na prethodno sklopljene i adekvatno obeležene kolone. Kolone su zatim centrifugirane 10 minuta na 14000x. Nakon zamene kolekcionihih tuba na kolonu sa

testiranom kao i na kolonu sa kontrolnom DNK je dodato po 480 µl 1xTE (*Agilent*). Kolone su ponovo centrifugirane 10 minuta na 14000xg. Nakon toga, kolone su prebačene u nove tube i naknadno centrifugirane 1 minut na 1000xg. Zatim je u tube sa prečišćenim uzorcima naliveno 1xTE do ukupnog volumena od 9,5 µl. Nakon kvantifikacije uzoraka na spektrofotometru, usledio je proces hibridizacije. Testirani uzorak je spojen sa kontrolnim. U tubu sa uzorcima je dodato 29 µl reakcione smeše za hibridizaciju (2 µl humane Cot-1 DNK, 4,5 µl blokirajućeg agensa i 22,5 µl hibridizacionog pufera (*Agilent*)). Smeša je promešana i kratko centrifugirana. Nakon centrifugiranja, usledila je inkubacija u trajanju od 3 minuta na 95°C, a potom 30 minuta na 37°C. Po završenoj inkubaciji tuba je centrifugirana 1 minut na 14000xg. U cilju hibridizacije sa probama, na pripremljeni mikročip je naliveno 40 µl hibridizacione smeše testirane i kontrolne DNK u cilju hibridizacije sa probama. Potom je urađeno ispiranje i skeniranje mikročipa. Utvrđivanje relativnog smanjenja ili povećanja fluorescentnog signala testiranog uzorka u odnosu na referentni je pomoću *Genomic Workbench 7.0* softvera. Interpretacija rezultata je rađena primenom ADM-2 algoritama, pri čemu su genomske regioni analizirani u odnosu na humani referentni genom hg18.

Za određeni broj pacijenata analiza je sprovedena primenom *Agilent SurePrint G3 Human CGH* array 8X60 kita (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Kalifornija, SAD) na isti način pri čemu je za analizu podataka korišćen program *CytoGenomics 2.9* (*Agilent*), a genomske regioni su analizirani u odnosu na humani referentni genom hg19.

Identifikovane varijante su klasifikovane prema vodičima i uputstvima Američkog koledža za medicinsku genetiku za interpretaciju varijanti. Varijante su klasifikovane kao benigne, varijante nepoznatog značaja (engl., *Variants of unknown significance*, VUS), verovatno patogene i patogene (Kearney *et al.*, 2011).

### 3.4.6. Sekvenciranje „kliničkog egzoma“

Sekvenciranje „kliničkog egzoma“ je rađeno primenom *Illumina TruSight One Sequencing* kita (*Illumina*, SAD) koji omogućava analizu kodirajućih egzona 4813 gena. Genomska biblioteka za proces sekvenciranja je pripremljena prema protokolu proizvođača (*Illumina*, SAD), a sekvenciranje je rađeno na *Illumina MiSeq* sekvenatoru. Bioinformatička obrada podataka je podrazumevala poravnavanje sekvenci prema humanom referentnom genomu hg19, upotrebom *Burrows-Wheeler Aligner* algoritma (v0.6.3) kao i uklanjanje duplikata sekvenci uz pomoć *Pickard MarkDuplicates* programa. Rekalibracija osnovnog skora kvaliteta, pozivanje varijanti (engl., *variant calling*) i filtriranje varijanti je rađeno pomoću *GATK* (engl., *genome analysis toolkit*) softverskog paketa. Za anotaciju varijanti korišćeni su *vTools* i *ANNOVAR* softveri. Određivanje pozicije detektovanih varijanti u transkriptu je rađeno pomoću *Refseq* baze. Podaci o učestalosti varijanti u svetskoj populaciji su zasnovane na informacijama GnomAD baze ako i interne baze Kliničkog instituta za medicinsku genetiku, Univerzitetskog kliničkog centra u Ljubljani. Za evaluaciju strukturnih varijanti korišćen je *CONIFER v0.2.2* softver. Predikcija patogenosti varijanti izmenjenog aminokiselinskog sastava je rađena pomoću *SNPeff v2* baze podataka, a procena efekta varijanti rađena je pomoću *SNPeff* prediktora. Za dodatnu interpretaciju detektovanih varijanti korišćeni su *in silico* kompjuterski prediktivni programi: *SIFT*, *Mutation taster* i *PolyPhen-2*.

Detektovane varijante su interpretirane u skladu sa preporukama Američkog koledža za medicinsku genetiku i asocijacije za molekularnu patologiju (ACMG/AMP) (Richards *et al.*, 2015). Prema ovim preporukama varijante su klasifikovane u 5 kategorija:

1. benigne varijante
2. verovatno benigne varijante
3. varijante nepoznatog značaja
4. verovatno patogene varijante
5. patogene varijante.

### 3.4.7. Baze podataka

Za ispitanike kod kojih su primenom genetičkih testiranja detektovane CNV/genske varijante, urađen je pregled literature kao i analiza genetičkih baza podataka (Tabela 3), u cilju utvrđivanja značaja detektovanih varijanti i utvrđivanja korelacije genotipa i fenotipa.

Tabela 3. Prikaz javno dostupnih baza podataka korišćenih za utvrđivanje značaja detektovanih hromozomskih/genskih varijanti kao i utvrđivanje genotipsko-fenotipske korelacije.

DECIPHER <a href="http://decipher.sanger.ac.uk">http://decipher.sanger.ac.uk</a>	Baza podataka koja sadrži podatke o korelaciji hromozomskih aberacija sa fenotipom.
OMIM Online Mendelian Inheritance in Man <a href="http://www.omim.org">http://www.omim.org</a>	Baza podataka koja sadrži informacije o humanim genima, genetičkim bolestima kao i informacije o korelaciji genetičkih varijanti sa bolestima.
ExAC Exome Aggregation Consortium <a href="http://exac.broadinstitute.org/">http://exac.broadinstitute.org/</a>	Baza podataka koja sadrži sekvence dobijenih sekvenciranjem celih egzoma 61,486 osoba koje nisu u srodstvu.
GnomAD Genome Aggregation Database <a href="https://gnomad.broadinstitute.org/">https://gnomad.broadinstitute.org/</a>	Baza podataka koja sadrži sekvence dobijenih sekvenciranjem 125,748 celih egzoma i 15,708 celih genoma osoba koje nisu u srodstvu.
HGMD Human Gene Mutation Database <a href="http://www.hgmd.org">http://www.hgmd.org</a>	Baza podataka koja sadrži informacije o objavljenim patološkim genskim varijantama
ClinVar <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>	Baza podataka koja sadrži informacije o korelaciji genskih aberacija sa fenotipom
PubMed <a href="https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov">https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov</a>	Baza koja omogućava pretragu i pronalaženje biomedicinske literature

### 3.4.8. Statistička analiza podataka

Za obradu rezultata sprovedenog istraživanja korišćene su metode deskriptivne i analitičke statistike. U cilju utvrđivanja korelacije između detektovanih varijanti i tipova USM, postojanja ekstrakardijalnih malformacija kao i smrtnih ishoda nastalih tokom prve godine života ispitanika, korišćen je Fišerov test tačne verovatnoće. Statistička obrada podataka je rađena pomoću SPSS 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) i R 3.4.2 (R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) softverskih programa. Vrednosti  $p < 0,05$  su smatrane statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 1.1. Rezultati kliničke evaluacije ispitanika

Sprovedeno istraživanje je obuhvatilo 100 novorođenčadi hospitalizovane na Odeljenju neonatalne intenzivne nege, Univerzitetske dečje klinike, zbog kompleksne ili kombinovane USM. Među njima 54 (54/100, 54%) novorođenčadi je bilo muškog pola, dok je 46 (46/100, 46%) bilo ženskog pola. Na osnovu tipa USM svi ispitanici su klasifikovani u 10 grupa (Botto et al., 2007), prikazanih u Tabeli 4.

Tabela 4. Klasifikacija ispitanika prema tipu USM

Tip USM	Broj ispitanika (%)	
Konotrunkalne	42/100	(42)
Anomalni utok plućnih vena	2/100	(2)
LVOTO	14/100	(14)
RVOTO	8/100	(8)
Septalni defekti	6/100	(6)
Heterotaksija	7/100	(7)
Jednokomorno srce/kompleksne USM	2/100	(2)
Septalni defekti+ LVOTO	9/100	(9)
Septalni defekti+RVOTO	6/100	(6)
Druge kombinacije USM	4/100	(4)

LVOTO-opstrukcija izlaznog trakta leve komore; RVOTO-opstrukcija izlaznog trakta desne komore

Pored USM, kod ispitanika su zabeleženi i drugi značajni klinički parametri koji su prikazani u Tabeli 5.



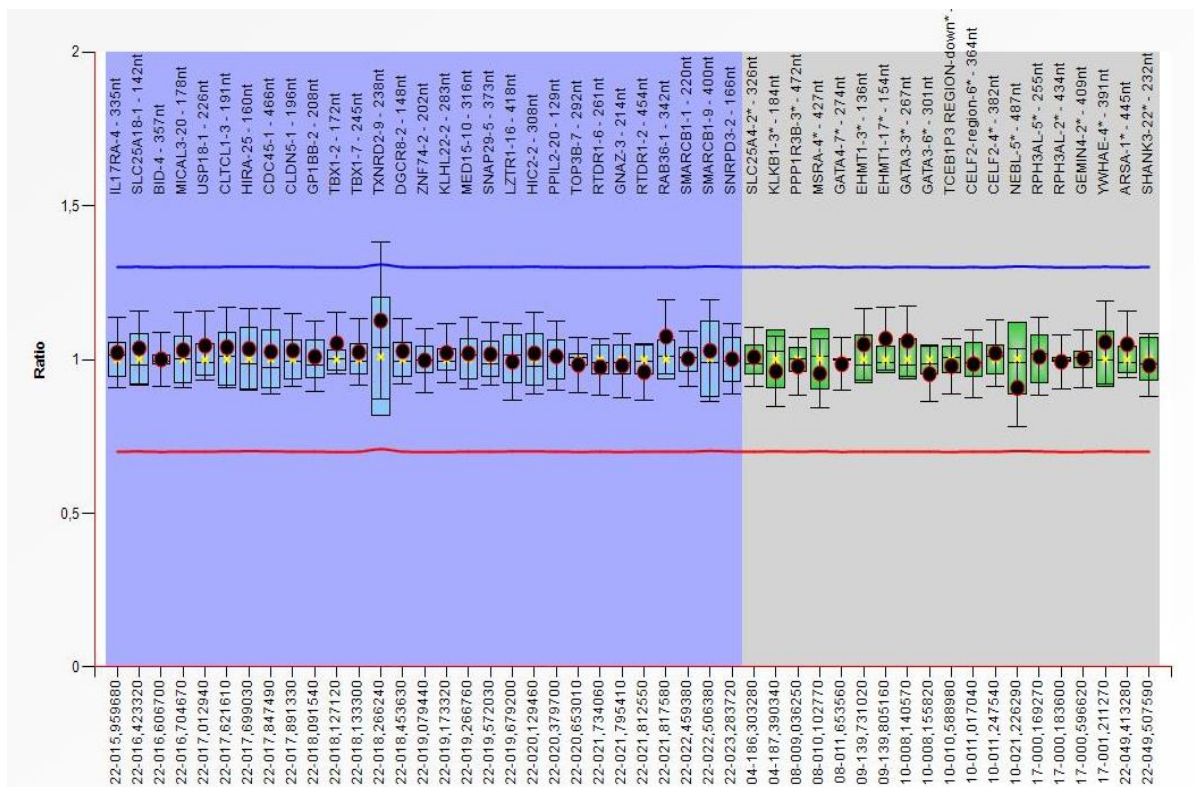
Tabela 5. Kliničke karakteristike ispitanika

Klinički parametri ispitanika	Broj ispitanika (%)	Ukupan broj ispitanika sa dostupnim podacima
Mala porođajna masa	15 (17,04)	88
Makrozomija	5 (5,68)	88
Abnormalni Apgar skor	15 (17,64)	85
Ekstrakardijalne malformacije	22 (22)	100
Minor facijalni dismorfizmi	56 (65,12)	86
Major kranijalni dismorfizmi	4 (4)	100
Strukturne anomalije mozga	3 (3)	100
Mikrocefalija	2 (2,94)	68
Makrocefalija	2 (2,94)	68
Skeletne anomalije	6 (6)	100
Urogenitalne anomalije	6 (6)	100
Druge major anomalije	4 (4)	100
Pozitivna porodična istorija	5 (5)	100
Pozitivna prenatalna istorija i dejstvo teratogena	6 (6)	100
Smrti ishoda	24 (27,90)	86

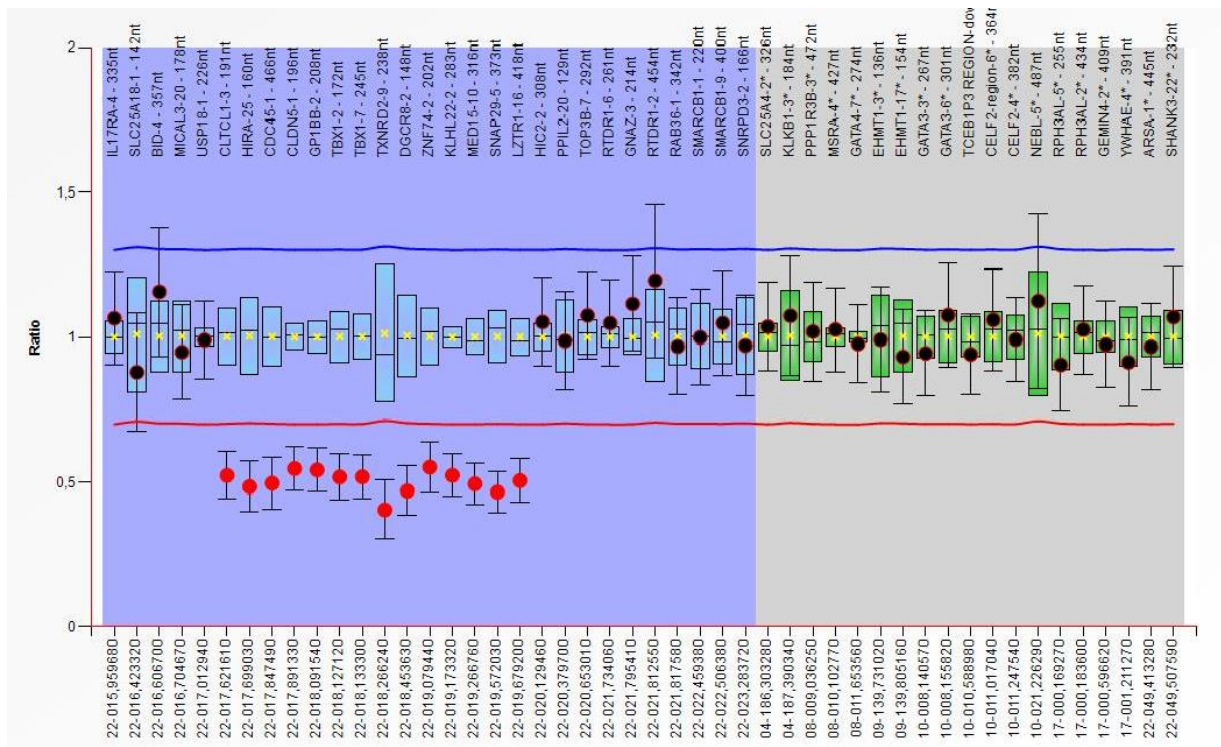
## 1.2. Rezultati MLPA analize

MLPA analiza primenom P311 i P250 kitova je urađena kod svih 100 ispitanika. Patološki rezultati su detektovani kod 10 ispitanika, pri čemu je stopa detekcije patoloških rezultata 10% (10/100). Kod devet ispitanika je utvrđeno prisustvo delecije u regionu 22q11.2 (detektovane sa oba kita, P311 i P250), dok je kod jednog ispitanika utvrđeno prisustvo delecije 3p25 regiona (detektovane P311 kitom). Na Slikama 4, 5, 6 i 7 prikazani su primeri normalnog i patoloških rezultata.

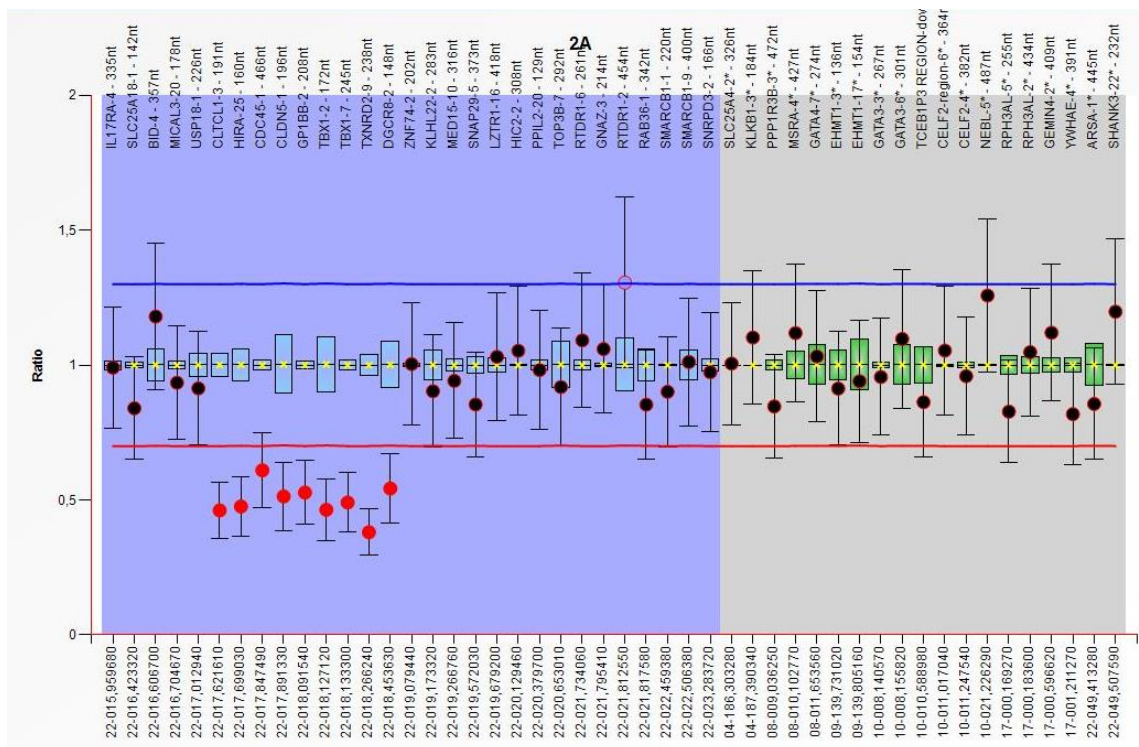
Među ispitanicima sa detektovanom delecijom u regionu 22q11. 2, uočene su delecije različite veličine (Slike 5 i 6). Kod osam ispitanika detektovane su delecije veličine 3 Mb (ispitanici pod br. 17, 17, 20, 21, 43, 57, 66 i 90) dok je kod jednog ispitanika detektovana delecija veličine 1,5 Mb (ispitanik pod br. 28). U cilju utvrđivanja porekla detektovanih varijanti kod roditelja četiri ispitanika je takođe urađena MLPA analiza. Roditelji ostalih ispitanika nisu bili dostupni za sprovođenje testiranja. Rezultati MLPA analize sa kliničkom slikom ispitanika su prikazani u Tabeli 6.



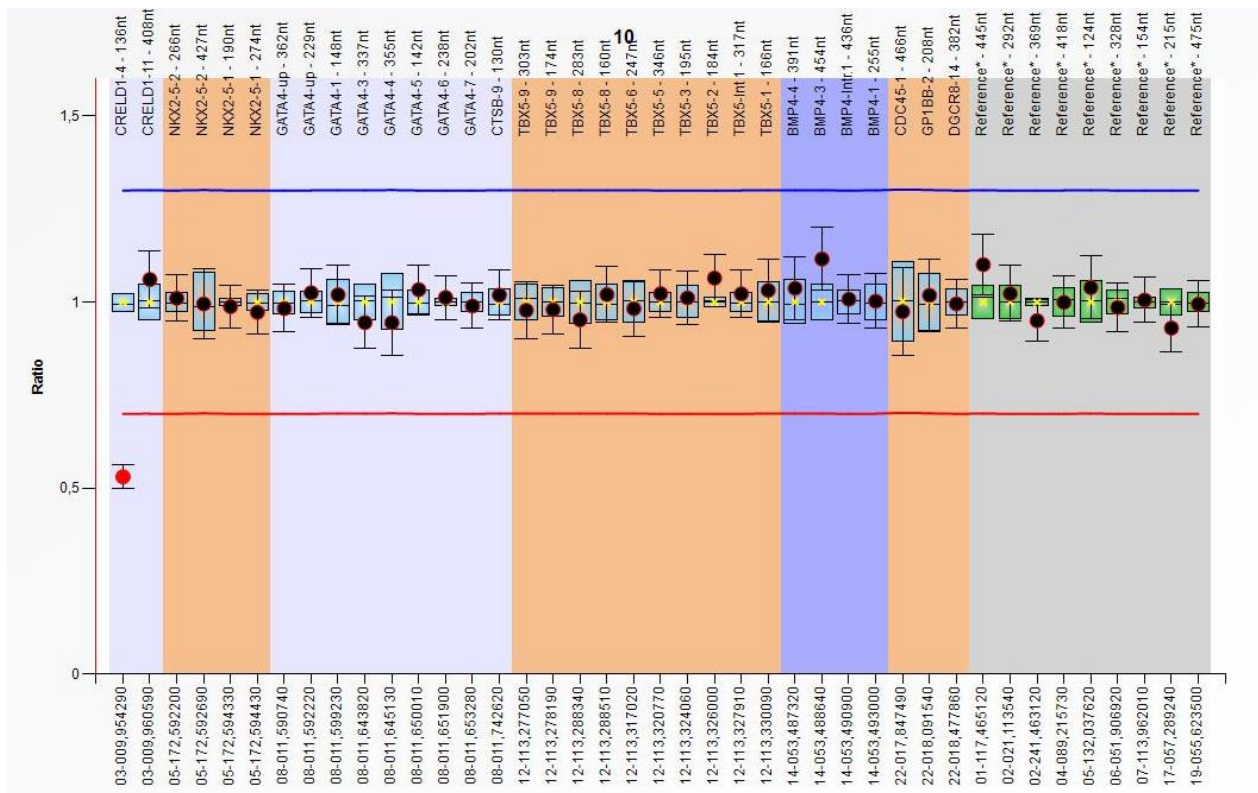
Slika 4. Prikaz normalnog rezultata MLPA analize urađene primenom P250 kita, dobijenog nakon softverske obrade podataka. Na X osi predstavljene su probe koje su sadržane u primenjenom P250 MLPA kitu. Na Y osi predstavljen je relativni odnos fluorescentnog signala svake amplifikovane probe testiranog uzorka i referentnih uzoraka.



Slika 5. Prikaz patološkog MLPA nalaza sa detektovanom delecijom u regionu 22q11.21, dobijenog nakon softverske obrade podataka. Na X osi predstavljene su probe koje su sadržane u primjenjenom P250 MLPA kitu. Na Y osi predstavljen je relativni odnos fluorescentnog signala svake amplifikovane probe testiranog uzorka i referentnih uzoraka. Za 14 proba koje odgovaraju regionu 22q11.21 uočava se smanjeni relativni odnos fluorescentnog signala što ukazuje na prisustvo delecije u regionu 22q11.21 koja odgovara veličine od oko 3 Mb.



Slika 6. Prikaz patološkog MLPA nalaza sa detektovanom delecijom u regionu 22q11.21, dobijenog nakon softverske obrade podataka. Na X osi predstavljene su probe koje su sadržane u primjenjenom P250 MLPA kitu. Na Y osi predstavljen je relativni odnos fluorescentnog signala svake amplifikovane probe testiranog uzorka i referentnih uzoraka. Za 9 proba koje odgovaraju regionu 22q11.21 uočava se smanjeni relativni odnos fluorescentnog signala, što ukazuje na prisustvo delecije u regionu 22q11.21 veličine od oko 1,5 Mb.



Slika 7. Prikaz patološkog MLPA nalaza sa detektovanom delecijom u regionu 3p25 dobijenog nakon softverske obrade podataka. Na X osi predstavljene su probe koje su sadržane u primenjenom P311 MLPA kitu. Na Y osi predstavljen je relativni odnos fluorescentnog signala svake amplifikovane probe testiranog uzorka i referentnih uzoraka. Za jednu probu koja odgovara regionu 3p25 uočava se smanjeni relativni odnos fluorescentnog signala, što ukazuje na prisustvo delecije u regionu 3p25.

Tabela 6. Rezultati MLPA analize

Broj pacijenta	Tip USM	Minor facijalni dismorfizmi	Ekstrakardijalne malformacije	MLPA P311 kit	MLPA P250 kit	Veličina varijante	Poreklo varijante
16	Zajednički arterijski trunkus	Da	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	/
17	Prekid aortnog luka, tip B	Da	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	/
20	Zajednički arterijski trunkus	Da	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	Maternalno
21	VSD, ASD	Da	Rascep nepca	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	/
28	Zajedničko arterijsko stablo	Ne	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	1.5 Mb	/
43	Prekid aortnog luka, tip B	Da	Ekvinovarus deformitet stopala	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	<i>de novo</i>
57	Atrezija plućne arterije, VSD	Da	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	/
66	Prekid aortnog luka tip C, VSD	Da	Rascep nepca	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	<i>de novo</i>
90	Koarktacija aorte, VSD	Da	Ne	Del3p25	Normalan	/	<i>de novo</i>
95	Prekid aortnog luka	Da	Ne	Del22q11.2	Del22q11.2	3 Mb	/

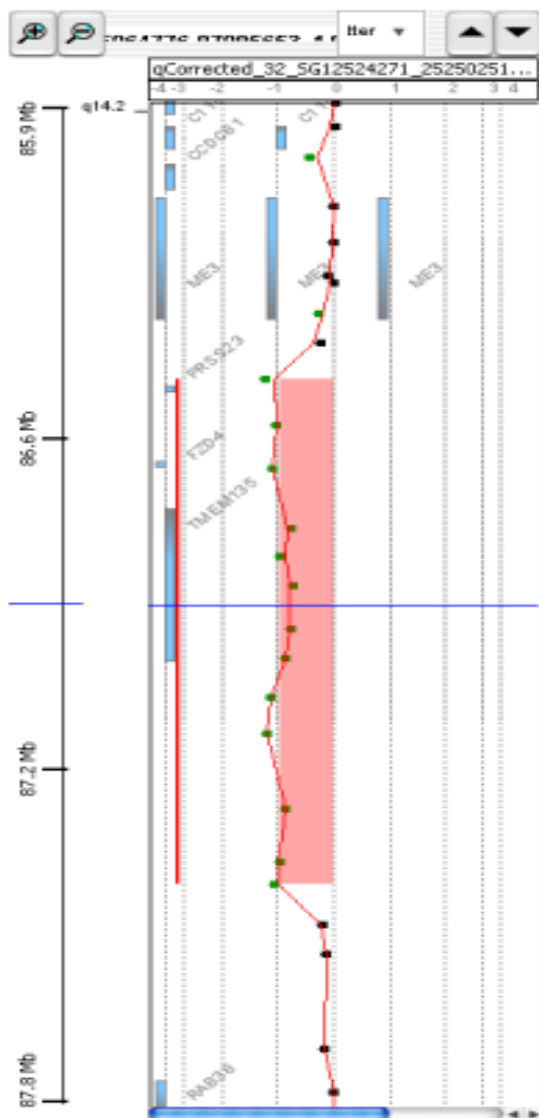
VSD-ventrikularni septalni defekt; ASD-atrijalni septalni defekt

### 1.3. Rezultati hromozomskog *microarray*-a

Kod 26 ispitanika koji su imali normalne nalaze MLPA analize urađena je analiza hromozomski *microarray* primenom *aCGH* tehnologije. Kod tri ispitanika su detektovane patogene/verovatno patogene varijante (stopa detekcije 11,54%, (3/26)), dok su kod četiri ispitanika detektovane varijante okarakterisane kao VUS (stopa detekcije 15,38%, (4/26)). Među patogenim i verovatno patogenim varijantama kod jednog ispitanika (ispitanik pod br. 29) je detektovana intersticijalna delecija dugog kraka hromozoma 11 (region 11q14.2, veličine oko 970 Kb, Slika 8), kod drugog ispitanika (ispitanik pod br. 33) je detektovana intersticijalna delecija dugog kraka hromozoma 5 (region 5q21.3-q23.1 veličine oko 10,5 Mb, Slika 9), dok je kod trećeg ispitanika (ispitanik pod br. 71) utvrđeno prisutvo terminalne delecije dugog kraka hromozoma 5 (region 5q35.2q35.3, veličine oko 4,94 Mb, Slika 10).

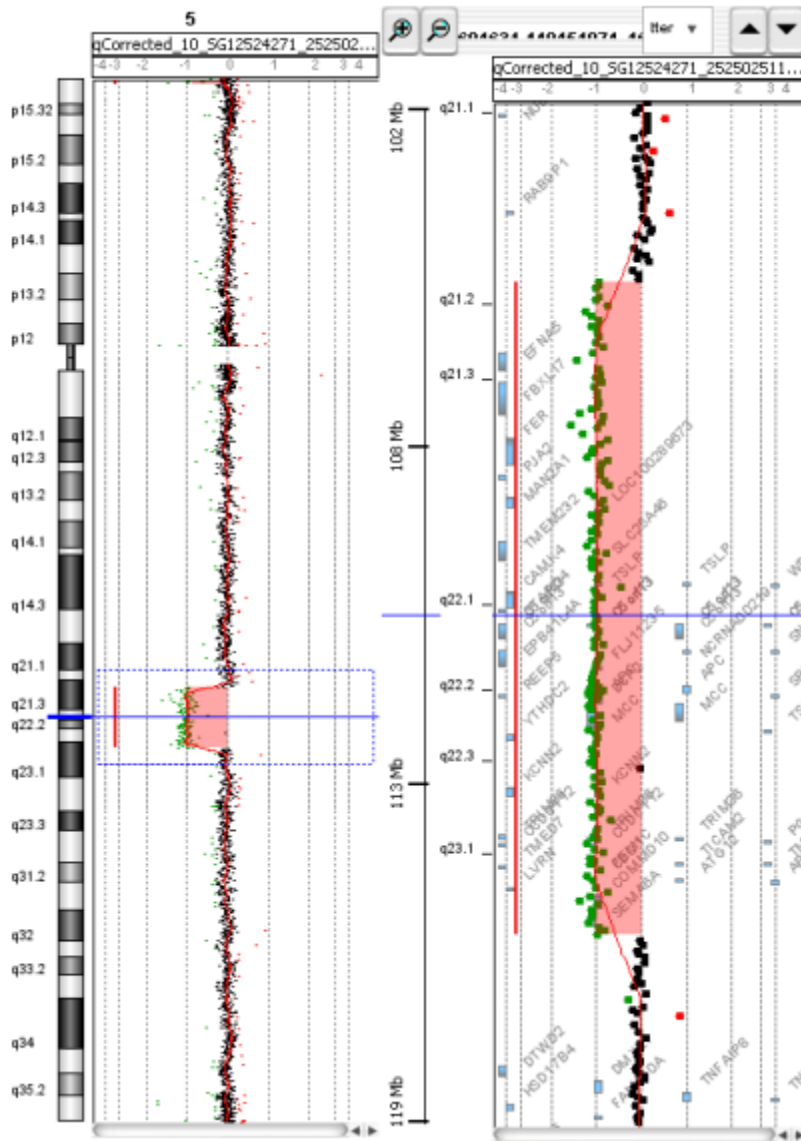
Dodatno, kod ispitanika pod br. 90, kod koga je MLPA analizom detektovana delecija 3p25, urađen je hromozomski *microarray* koji je potvrdio prisustvo ove delecije (Slika 11). U cilju utvrđivanja porekla ili utvrđivanja značaja detektovanih varijanti kod roditelja pet ispitanika je takođe urađena analiza hromozomski *microarray*. Ostali roditelji nisu bili dostupni za testiranje. Detaljan prikaz rezultata analize hromozomski *microarray* sa kliničkom slikom ispitanika je predstavljen u Tabeli 7.



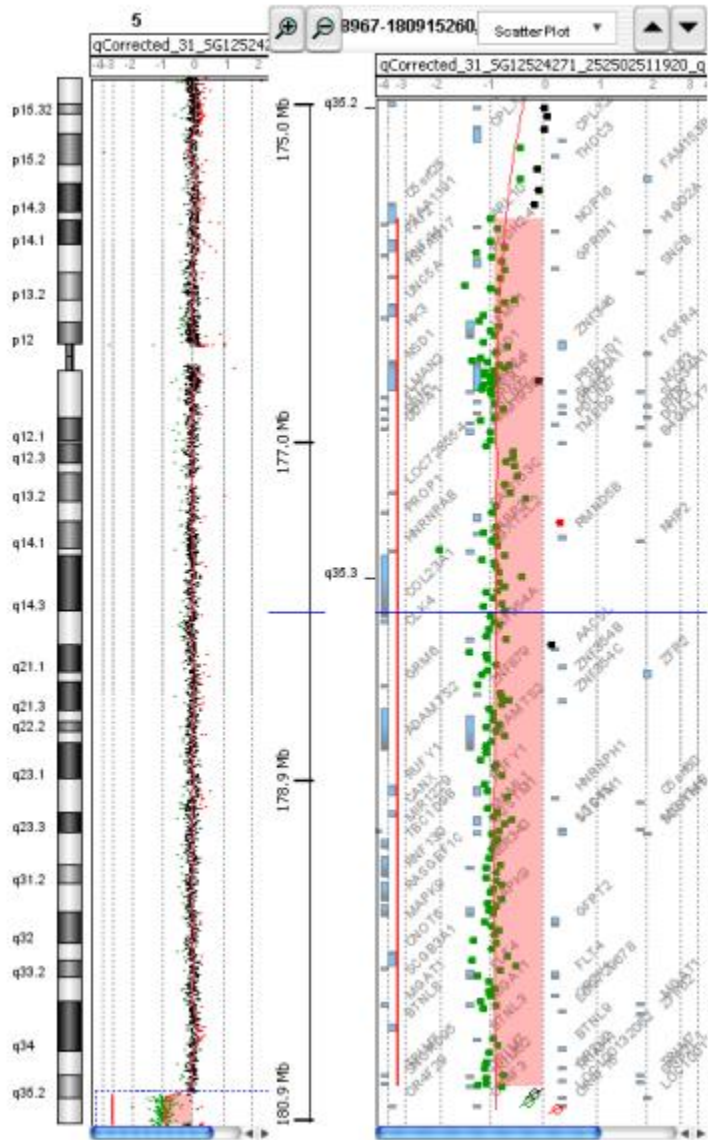


Slika 8. Prikaz intersticijalne delecije regiona 11q14.2 veličine oko 970 Kb, detektovane analizom hromozomski *microarray*. Na X osi su predstavljene korišćene DNK probe u skladu sa njihovom fizičkom lokalizacijom na hromozomu 11. Y osa predstavlja  $\log_2$  intenziteta fluorescentnih obeleživača testiranog i kontrolnog uzorka. Vrednosti relativnog odnosa fluorescentnih signala -1 (Y osa) ukazuje da je kod testiranog pacijenta prisutna delecija regiona 11q14.2 veličine oko 970 Kb.

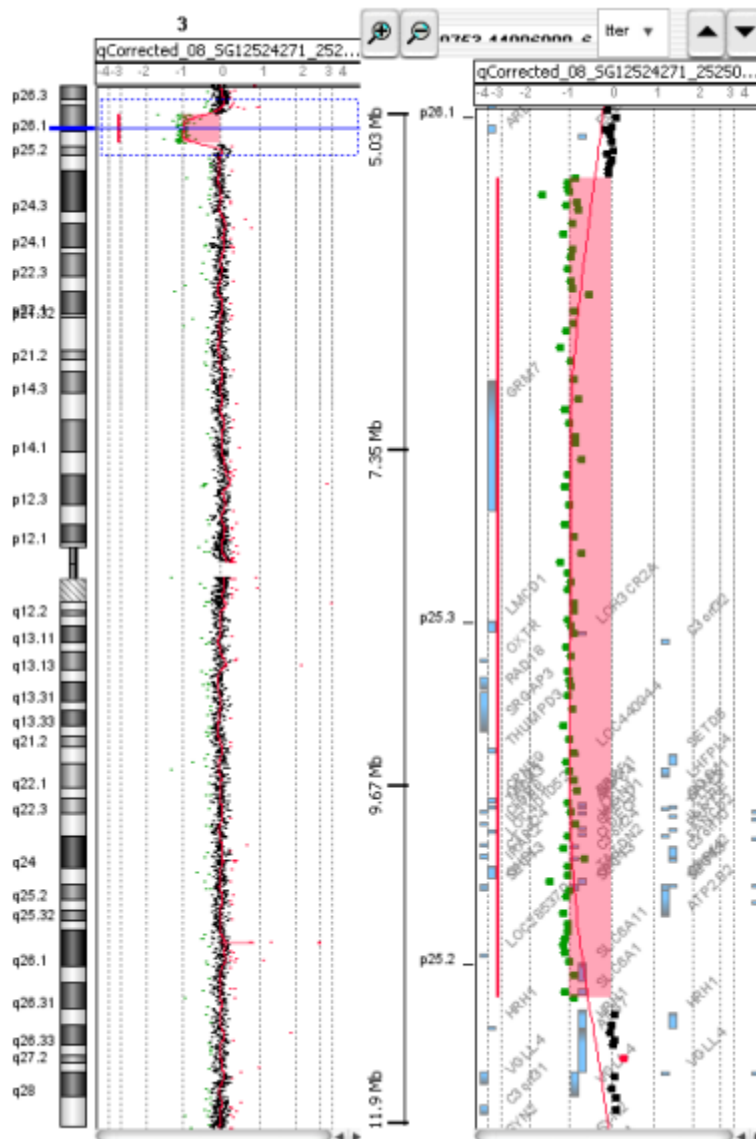




Slika 9. Prikaz intersticijalne delecije u regionu 5q21.3-q23.1 veličine oko 10,5 Mb detektovane analizom hromozomski *microarray*. Na X osi su predstavljene korišćene DNK probe u skladu sa njihovom fizičkom lokalizacijom na hromozomu 5. Y osa predstavlja log<sub>2</sub> intenziteta fluorescentnih obeleživača testiranog i kontrolnog uzorka. Vrednosti relativnog odnosa fluorescentnih signala -1 (Y osa) ukazuje da je kod testiranog pacijenta prisutna delecija regiona 5q21.3-q23.1 veličine oko 10,5 Mb.



Slika 10. Prikaz terminalne delecije regiona 5q35.2q35.3 veličine oko 4,94 Mb detektovane analizom hromozomski *microarray*. Na X osi su predstavljene korišćene DNK probe u skladu sa njihovom fizičkom lokalizacijom na hromozomu 5. Y osa predstavlja  $\log_2$  intenziteta fluorescentnih obeleživača testiranog i kontrolnog uzorka. Vrednosti relativnog odnosa fluorescentnih signala -1 (Y osa) ukazuje da je kod testiranog pacijenta prisutna delecija regiona 5q35.2q35.3 veličine oko 4,94 Mb.



Slika 11. Prikaz intersticijalne delecije regiona 3p26.1p25.3 veličine oko 5,57 Mb detektovane analizom hromozomski *microarray*. Na X osi su predstavljene korišćene DNK probe u skladu sa njihovom fizičkom lokalizacijom na hromozomu 3. Y osa predstavlja  $\log_2$  intenziteta fluorescentnih obeleživača testiranog i kontrolnog uzorka. Vrednosti relativnog odnosa fluorescentnih signala -1 (Y osa) ukazuje da je kod testiranog pacijenta prisutna delecija regiona veličine oko 5,57 Mb.

Tabela 7. Rezultati hromozomskog *microarray*-a

Broj pacijenta	Tip USM	Druge značajne abnormalnosti	aCGH rezultat	Klasifikacija varijante	Povezanost varijante sa USM	Poznat sindrom (OMIM)	Sadržaj gena (OMIM)	Poreklo varijante
6	Atrezija plućne arterije	Mala porođajna masa, abnormalni AS, minor facijalni dismorfizmi	arr[GRCh37]21q22.3(47864658_48090317)x1 ~ 225 Kb	VUS	Ne	Ne	<i>PCNT</i> (605925)	Maternalno
29	Kritična stenoza plućne arterije	Mala porođajna masa, minor facijalni dismorfizmi, deformitet stopala	arr[GRCh37]8q11.23q12.1(52607074_55211052)x1	VUS	Ne	Ne	<i>RB1CC1</i> (606837)	<i>de novo</i>
			arr[GRCh37] 8q12.1(57075931_58653452)x1	VUS	Ne	Ne	<i>PLAG1</i> (603026)	<i>de novo</i>
			arr[GRCh37] 8q12.1(59040930_59377178)x1 kompleksni rearanžman na hromozomu 8 koji čine tri delecije ukupne veličine oko 4,5 Mb	VUS	Ne	Ne	<i>IMPAD1</i> (614010)	<i>de novo</i>
			arr[GRCh37]11q14.2(86498626_87468956)x1 ~ 970 Kb	Verovatno patogena	Ne	Ne	<i>FZD4</i> (604579)	<i>de novo</i>
33	VSD, ASD	Minor facijalni dismorfizmi postaksijalna polidaktilija	arr[GRCh37] 3q26.1(161297646_161398104)x1 ~ 100 Kb	VUS	Ne	Ne	Ne	Paternalno
38	Tetralogija Fallot	Minor facijalni dismorfizmi, urogenitalne anomalije, atrezija anusa	arr[GRCh37]5q21.3q23.1(105579752_116068450)x1 ~ 10,5 Mb	Patogena	Da	Ne	<i>APC</i> (611731) <i>MCC</i> (159350)	/
59	Situs ambiguus sa desnim atrijalnim izomerizmom TAUPV	/	arr[GRCh37] Xq21.32(91951084_92591737)x1 ~ 640 Kb	VUS	Ne	Ne	Ne	Maternalno

71	VSD, ASD	Minor facijalni dismorfizmi	arr[GRCh37]5q35.2q35.3(175750397_180696806)x1 ~ 4.94 Mb	Patogena	Da	Sotos sindrom (117550);  5q35.3 subtelomer. delecioni sindrom	<i>NSD1</i> (606681)	/
78	Hemitrunkus arteriozus	Minor facijalni dismorfizmi	arr[hg19] 19q13.41(51729565_52024592)x1 ~295 Kb	VUS	Ne	Ne	<i>LIM2</i> (154045) <i>ETFB</i> (130410)	/
90	Koarktacija aorte, VSD	Mala porođajna masa, minor facijalni dismorfizmi	arr[GRCh37]3p26.1p25.3(5521840_11097995)x1 ~5.57 Mb	Patogena	Da	3p-sindrom (613792)	<i>CAV3</i> (601253) <i>CRELD1</i> (607170) <i>SETD5</i> (615743) <i>BRPFI</i> (602410)	<i>de novo</i>

---

AS-Apgar skor; VSD-ventrikularni septalni defekt; ASD-atrijalni septalni defekt, TAUPV-totalni anomalni utok plućnih vena; VUS-varijanta nepoznatog značaja

#### 4.4. Rezultati sekvenciranja „kliničkog egzoma“

Kod pet ispitanika kod kojih MLPA analizom i analizom hromozomski *microarray*-a nije utvrđeno postojanje uzročne genetičke abnormalnosti, urađeno je sekvenciranje „kliničkog egzoma“. Kod tri (3/5) ispitanika su detekovane patogene/verovatno patogene varijante koje uzrokuju Bardet-Biedl sindrom tip 12, Kabuki sindrom i primarnu cilijarnu diskineziju. U cilju potvrde patogenosti detektovanih varijanti kod roditelja sva tri ispitanika su urađene segregacione analize primenom metode sekvenciranja po Sangeru.

Detaljan prikaz patoloških nalaza detektovanih primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ je prikazan u Tabeli 8.

Tabela 8. Rezultati sekvenciranja „kliničkog egzoma“.

Broj pacijenta	Tip USM	Druge značajne abnormalnosti	CES rezultat	Efekat na aminokis. sekvencu	Klasifikacija varijante	Sindrom (OMIM)	Obrazac nasleđivanja
33	VSD, ASD	Minor facijalna dismorfija, postaksijalna polidaktilija	Homizigotna c.1063C>T (NM_001178007) u <i>BBS7</i> genu	Arg355Ter	Patogena	Bardet Biedl sindrom tip 12 (615989)	AR
44	DORV, VSD, ASD	mala porođajna masa, abnormalni AS, facijalna dismorfija, skeletne anomalije	Heterozigotna c.858dupT (NM_003482.3) u <i>KMT2D</i> genu	Lys287fs	Verovatno patogena	Kabuki sindrom tip 1 (147920)	AD
59	Situs ambiguus sa desnim atrijalnim izomerizmom TAUPV	/	c.11666C>G (NM_001372.3) u <i>DNAH9</i> genu (pat) c.308dupT (NM_001372.3) u <i>DNAH9</i> genu (mat)	Ser3889X  Leu104fs	Patogena	Primarna cilijarna diskinezija (244400)	AR

VSD-ventrikularni septalni defekt; ASD-atrijalni septalni defekt; DORV-dvostruko ishodište velikih arterija iz desne komore; TAUPV-totalni anomalni utok plućnih vena; CES-kliničko egzomosko sekvenciranje; AR-autozomno recesivno; AD-autozomno dominantno, mat-maternano; pat-paternalno.

## 4.5. Stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih varijanti

Na osnovu rezultata sprovedenih genetičkih testiranja, patogene/verovatno patogene varijante su detektovane kod 10 (10%) novorođenčadi primenom MLPA analize, kod 3 (3%) novorođenčadi primenom aCGH analize i kod 3 (3%) novorođenčadi primenom kliničkog egzomskog sekvenciranja. Stope detekcija patogenih/verovatno patogenih varijanti primenom sprovedenih genetičkih testiranja kod ispitanika sa sindromskim USM i nesindromskim USM su prikazane u Tabeli 9, a distribucija dobijenih patoloških rezultata prema tipu USM ispitanika je prikazana u Tabeli 10.

Tabela 9. Stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih varijanti i sindromske vs. nesindromske USM.

Tip USM	Broj pacijenata (%)	Broj pacijenata sa patološkim rezultatima MLPA analize (%)	Broj pacijenata sa patološkim rezultatima aCGH analize (%)	Broj pacijenata sa patološkim rezultatima CES analize (%)
Sindromske	68/92 (73,91)	9/68 (13,23)	4/68 (5,88)	2/68 (2,94)
Nesindromske	24/92 (26,09)	1/24 (4,17)	/	1/24 (4,17)

CES-kliničko egzomsko sekvenciranje

Tabela 10. Distribucija patoloških rezultata sprovedenih genetičkih testiranja među tipovima USM.

Tip USM	Broj pacijenata (%)	Broj pacijenata sa patološkim MLPA rezultatima (%)	Broj pacijenata sa patološkim aCGH rezultatima (%)	Broj pacijenata sa patološkim CES rezultatima (%)
Konotrunkalne	42/100 (42)	7/42 (16,67)	1/42 (2,38)	1/42 (2,38)
AUPV	2/100 (2)	/	/	/
LVOTO	14/100 (14)	/	/	/
RVOTO	8/100 (8)	/	1/8 (12,50)	/
Septalni defekti	6/100 (6)	1/6 (16,67)	1/6 (16,67)	1/6 (16,67)
Heterotaksija	7/100 (7)	/	/	1/7 (14,29)
Jednkomorno srce/kompleksne USM	2/100 (2)	/	/	/
Septalne USM+ LVOTO	9/100 (9)	1/9 (11,11)	1/9 (11,11)	/
Septalne USM+RVOTO	6/100 (6)	1/6 (16,67)	/	/
Ostalo	4/100 (4)	/	/	/

AUPV-Anomalni utok plućnih vena; LVOTO-opstrukcija izlaznog trakta leve komore; RVOTO-opstrukcija izlaznog trakta desne komore

#### 4.6. Rezultati statističke analize

Statistička analiza podataka je pokazala da ne postoji statistički značajna korelacija između detektovanih patogenih varijanti i tipa USM, postojanja ekstrakardijalnih malformacija i letalnog ishoda ispitanika. Rezultati statističke obrade podataka su prikazani u Tabeli 11.



Tabela 11. Rezultati statističke obrade podataka primenom Fišerovog testa tačne verovatnoće

		MLPA				P vrednost
		normalan nalaz broj ispitanika n, %		patološki nalaz broj ispitanika n, %		
Pol	Muški	47	52,2%	7	70,0%	0,335
	Ženski	43	47,8%	3	30,0%	
Abnormalna porođajna masa	Ne	63	77,8%	5	71,4%	0,741
	Mala porođajna masa	13	16,0%	2	28,6%	
	Makrozomija	5	6,2%	0	0,0%	
Abnormalan Apgar skor	Ne	64	81,0%	6	100,0%	0,585
	Da	15	19,0%	0	0,0%	
Ekstrakardijalne malformacije	Ne	71	78,9%	7	70,0%	0,687
	Da	19	21,1%	3	30,0%	
Minor kraniofacijalni dismorfizam	Ne	29	38,2%	1	10,0%	0,155
	Da	47	61,8%	9	90,0%	
Major kraniofacijalni dismorfizam	Ne	88	97,8%	8	80,0%	0,049
	Da	2	2,2%	2	20,0%	

Strukturne anomalije mozga/CNS	Ne	87	96,7%	10	100,0%	1,000
	Da	3	3,3%	0	0,0%	
Mikro/Makro cefalija	Ne	60	93,8%	4	100,0%	1,000
	Mikrocefalija	2	3,1%	0	0,0%	
	Makrocefalija	2	3,1%	0	0,0%	
Motorno kašnjenje u razvoju	Ne	54	84,4%	5	83,3%	1,000
	Da	10	15,6%	1	16,7%	
Skeletne anomalije	Ne	85	94,4%	9	90,0%	0,478
	Da	5	5,6%	1	10,0%	
Urogenitalne anomalije	Ne	83	92,2%	10	100,0%	1,000
	Da	7	7,8%	0	0,0%	
Major mane drugih orgaskih sistema	Ne	86	95,6%	10	100,0%	1,000
	Da	4	4,4%	0	0,0%	
Pozitivna porodična anamneza	Ne	85	94,4%	10	100,0%	1,000
	Da	5	5,6%	0	0,0%	
Pozitivna prenatalna anamneza i izloženost teratogenima	Ne	84	93,3%	10	100,0%	1,000
	Da	6	6,7%	0	0,0%	
Letalni ishod	Ne	55	71,4%	7	77,8%	1,000
	Da	22	28,6%	2	22,2%	
Konotrunkalne USM	Ne	55	61,1%	3	30,0%	0,090
	Da	35	38,9%	7	70,0%	

Abnormalni utok plućnih vena	Ne	88	97,8%	10	100,0%	1,000
	Da	2	2,2%	0	0,0%	
LVOTO	Ne	68	75,6%	9	90,0%	0,446
	Da	22	24,4%	1	10,0%	
RVOTO	Ne	77	85,6%	9	90,0%	1,000
	Da	13	14,4%	1	10,0%	
Septalni defect	Ne	72	80,0%	7	70,0%	0,434
	Da	18	20,0%	3	30,0%	
Heterotaksija	Ne	83	92,2%	10	100,0%	1,000
	Da	7	7,8%	0	0,0%	
Jednokomorno srce	Ne	88	97,8%	10	100,0%	1,000
	Da	2	2,2%	0	0,0%	
Septalni defekt + RVOTO	Ne	85	94,4%	9	90,0%	0,478
	Da	5	5,6%	1	10,0%	
Septalni defekt+ LVOTO	Ne	82	91,1%	9	90,0%	1,000
	Da	8	8,9%	1	10,0%	
Druge kombinacije USM	Ne	86	95,6%	10	100,0%	1,000
	Da	4	4,4%	0	0,0%	

## 5. DISKUSIJA

Genetička osnova nastanka USM je heterogena i samim tim izazovna za istraživanja (Zaidi and Brueckner, 2017). Kod pacijenata sa USM se mogu detektovati kako aneuploidije i krupne strukturne aberacije hromozoma, tako i submikroskopske hromozomske abnormalnosti, ali i genske varijante (Pierpont *et al.*, 2018). Epidemiološke studije su pokazale da su submikroskopske CNV, odnosno delecije i duplikacije, najčešći genetički uzročnici USM, te su zbog toga predmet brojnih istraživanja. Literaturni podaci ukazuju da se u kliničkoj praksi kod pacijenata sa USM genetička testiranja ne primenjuju na jedinstven način u svim centrima (Buckley *et al.*, 2014). Za detekciju submikroskopskih CNV se najčešće primenjuju FISH, MLPA i *array* tehnologija, dok se genske varijante detektuju primenom sekvenciranja gena metodom po Sangeru kao i NGS tehnologijom (Pierpont *et al.*, 2018; Chaix *et al.*, 2016; Geddes and Earing, 2018). U nekim zemljama, kao test prvog izbora se najčešće primenjuje hromozomski *microarray*. Ova analiza omogućava detekciju submikroskopskih CNV odnosno delecija i duplikacija duž čitavog genoma. Međutim, visoka cena ovog testa ograničava njegovu primenu kod svih pacijenata u zemljama sa ograničenim resursima, gde se često traga za dostupnijim tehnologijama (Zanardo *et al.*, 2017). S obzirom da se FISH tehnologijom analiziraju pojedinačni hromozomski regioni, u poslednje vreme se sve više primenjuje MLPA analiza koja omogućava istovremenu detekciju CNV na velikom broju odabranih hromozomskih lokusa (Zaidi and Brueckner, 2017; Stupia *et al.*, 2012). Stopa detekcije patoloških rezultata primenom MLPA tehnologije zavisi od selekcije pacijenata kao i od odabira MLPA kitova koji se primenjuju za analizu. U literaturi se mogu naći podaci o stopi detekcije patoloških rezultata primenom MLPA tehnologije kod pacijenata sa sindromskim formama USM, zatim kod pacijenata sa nesindromskim USM kao i kod pacijenata sa konotrukarnim i sporadičnim USM (Sorensen *et al.* 2012; Monteiro *et al.*, 2014; Nagy *et al.*, 2019; Mutlu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Delea *et al.*, 2018). Nova istraživanja koja bi ispitivala primenu MLPA tehnologije kod drugih grupa pacijenata bi mogla da doprinesu široj primeni ove tehnologije, naročito u centrima gde nije moguće primenjivati hromozomski *microarray*, adekvatnijem odabiru MLPA kitova koji se primenjuju pri izvođenju analize i dizajniranju novih kitova koji bi se primenjivali kod pacijenta sa USM.

Ovo istraživanje je bazirano na detekciji i karakterizaciji genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritično teškim USM, sa ciljem boljeg razumevanja molekularnih mehanizama nastanka USM, unapređenja primene genetičkih testova u svakodnevnoj kliničkoj praksi, efikasnije dijagnostike i lečenja. Studija je imala za cilj da utvrdi stopu detekcije submikroskopskih genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritičnim USM primenom savremenih genetičkih testova kao što su MLPA, hromozomski *microarray* i sekvenciranje „kliničkog egzoma“, uz analizu genotipsko-fenotipske korelacije.

MLPA analiza je rađena primenom P311 i P250 MLPA kitova. P311 MLPA kit je pogodan za primenu kod pacijenata sa USM jer sadrži veliki broj proba koje su komplementarne različitim hromozomskim lokusima koji se dovode u vezu sa nastankom USM. Nedostatak ovog kita jeste to što njegovom primenom nije moguće proceniti veličinu detektovanih CNV, s obzirom da je sadržaj proba takav da je svaki hromozomski region pokriven sa malim brojem proba (najčešće 1, 2 ili 3 probe). Takođe, u slučaju detekcije delecije/duplikacije, rezultat je potrebno potvrditi drugim MLPA kitom ili drugom tehnologijom, što je opšta preporuka za sve

MLPA kitove. P250 MLPA kit je pogodan za primenu kod pacijenata kod kojih postoji sumnja na 22q11.2 mikrolecioni sindrom, kao i kod pacijenata koji imaju sličan fenotip ovom sindromu, a koji uzrokuju CNV u regionima 4p, 8p, 9q, 10p,17p i 22q13. S obzirom da ovaj kit sadrži 29 proba koje su komplementarne regionu 22q11.2, njegova primena omogućava procenu veličine detektovanih delecija u regionu 22q11.2, a pogodan je i za potvrdu rezultata dobijenih drugim MLPA kitovima. Ranije sprovedene inostrane studije koje su primenjivale MLPA tehnologiju kod pacijenata sa USM su imale drugačiji dizajn, a stopa detekcije patogenih hromozomskih varijanti je iznosila 3-29,3% (Monteiro *et al.*, 2017; Delea *et al.*, 2018; Mutlu *et al.*, 2018; Sorensen *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018). U cilju boljeg razumevanja metodoloških razlika i postignutih rezultata, ukratko će biti predstavljena glavna obeležja prethodno sprovedenih studija.

U istraživanju koje su sprovveli Monteiro i saradnici stopa detekcije patogenih CNV kod 47 testiranih pacijenta sa sindromskim USM primenom MLPA tehnologije je iznosila 23,4%. MLPA analiza je rađena primenom tri MLPA kita: P064B2/C1, P070B1/B2 i P036/E2 kita. P064B2/C1 MLPA kit sadrži probe za najčešće mikrolecione/mikroduplicacione sindrome kao što su 22q11.2 delecioni sindrom, Williams-Beuren sindrom (del 7q11), Smith-Magenis sindrom (del 17p11), 1p36 delecioni sindrom i Prader Willi/Angelman sindrom (del 15q). P070-B1/B2 i P036/E2 MLPA kitovi sadrže probe za detekciju subtelomernih hromozomskih regiona (Monteiro *et al.*, 2017). Delea i saradnici su primenom MLPA analize kod 219 pacijenata mlađih od 16 godina, a koji su imali konotrunkalne USM, patološke rezultate detektovali kod 29,03% ispitanika. MLPA analiza je rađena primenom P424 MLPA kita koji sadrži probe za 37 najčešćih hromozomskih lokusa povezanih sa nastankom USM kao i primenom P250 kita koji je korišćen i u našem istraživanju (Delea *et al.*, 2018;). U studiji koju su sprovveli Mutlu i saradnici, a koja je podrazumevala detekciju CNV primenom P311 MLPA kita kod 45 ispitanika sa nesindromskim septalnim defektima, stopa detekcije patoloških rezultata je iznosila 6,6% (Mutlu *et al.*, 2018). Sorensen i saradnici su kod 402 ispitanika sa USM primenom posebno dizajniranog MLPA kita koji sadrži probe za 25 hromozomskih regiona povezanih sa nastankom USM, patogene CNV detektovali kod 3,2% (Sorensen *et al.*, 2012). U studiji koji su sprovveli Li i saradnici čiji je predmet istraživanja bio detekcija CNV kod 167 pacijenata uzrasta od 2 meseca do 17 godina sa sporadičnim USM (VSD, ASD, TOF, patentni ductus arteriosus) primenom P311 MLPA kita, stopa detekcije patoloških rezultata je iznosila 3% (Li *et al.*, 2018)

Naši rezultati ukazuju da je stopa detekcije patoloških rezultata MLPA analizom primenom P250 i P311 MLPA kitova kod novorođenčadi sa kritično teškim USM 10%. Prema našim saznanjima ovo je prva studija koja je ispitivala primenu MLPA tehnologije u neselektovanoj kohorti novorođenčadi sa kritičnim USM hospitalizovane na intenzivnoj nezi. Takođe, ovo je prva studija u Srbiji koja je analizirala genomske submikroskopske hromozomske abnormalnosti kod novorođenčadi sa USM. Tri prethodno objavljene inostrane studije u kojima je primenjivana MLPA tehnologija su imale manju stopu detekcije od naše (3-6,6 %), dok su dve studije imale veću stopu detekcije (23,4 i 29%) (Li *et al.*, 2018; Mutlu *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2017; Delea *et al.*, 2018). U dve studije sa manjom stopom detekcije od naše, korišćen je P311 MLPA kit, međutim odabir pacijenata u ovim studijama je bio drugačiji. Jedna studija je uključila pacijente sa nesindromskim septalnim defektima, dok je druga uključila pacijente sa sporadičnim USM (Li *et al.*,2018; Mutlu *et al.*, 2018). Studije sa većom stopom detekcije patoloških rezultata su uključile samo pacijente sa sindromskim USM ili samo pacijente sa konotrunkalnim USM. Takođe, ove studije su za MLPA analizu primenjivale kitove koji sadrže

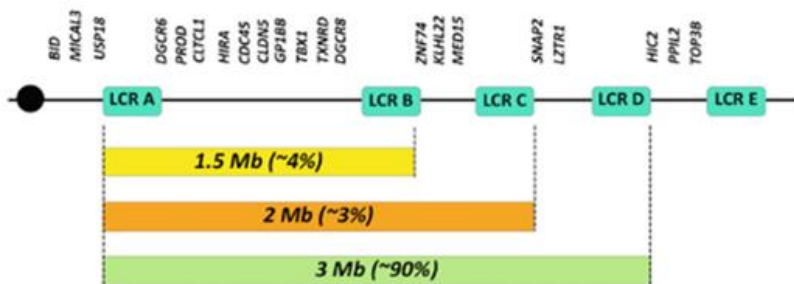
probe za više hromozomskih regiona od onih kojih su korišćeni u našoj studiji, ali i kita koji sadrži probe za hromozomske regione koji nisu specifičani samo za nastanak USM, kao što je P070 MLPA kit koji sadrži probe za subtelomerne regione, čija je primena indikovana kod pacijenata sa kašnjenjem u razvoju i intelektualnim poteškoćama (Monteiro *et al.*, 2017; Delea *et al.*, 2018). S obzirom da su sve ove studije imale drugačiji dizajn od naše, direktno poređenje naših rezultata sa prethodno objavljenim nije moguće. Ipak, imajući u vidu da je 3-25% USM uzrokovano CNV (Pierpont *et al.*, 2018), naši rezultati ukazuju da primena MLPA tehnologije kod neselektovane novorođenčadi sa kritično teškim USM, može rezultovati značajnom stopom detekcije patoloških rezultata. Realna stopa je verovatno veća od postignute, jer pretpostavljamo da neki hromozomski regioni koji mogu doprineti složenoj patogenezi USM, nisu pokriveni probama MLPA kitova koje smo primenjivali, što predstavlja ograničenje primenjene metode.

Među ispitanicima sa detektovanim patogenim varijantama primenom MLPA analize u našoj studiji, kod 9/10 ispitanika je utvrđeno prisustvo delecije u regionu 22q11.2 (Tabela 6). Ova delecija uzrokuje najčešći mikrodelecioni sindrom koji karakteriše varijabilna klinička slika uključujući abnormalnosti srca, nepca, gastrointestinalnog, endokrinog i genitourinarnog sistema kao i prisustvo facijalne dismorfije, kašnjenja u razvoju i psihijatrijskih poremećaja u adolescenciji i odrasloj dobi (McDonald-McGinn *et al.*, 2015). Kliničke manifestacije ovog sindroma variraju u zavisnosti od uzrasta, što ponekad može otežati postavljane kliničke dijagnoze, naročito kod novorođenčadi (Pierpont *et al.*, 2018). Analizirajući kliničku sliku naših ispitanika utvrđeno je da je ona u skladu sa podacima iz literature (Jones *et al.*, 2006). Kod pacijenta br. 16 je utvrđeno prisustvo zajedničkog arterijskog stabla tip III, prekid aortnog luka tip B kao i karaktersistična facijalna dismorfija, dok je kod pacijenta br. 17 dijagnostikovano prekid aortnog luka tip B uz VSD i ASD, zatim prisustvo makrocefalije i facijalne dismorfije (mala usta). Od kliničkih manifestacija kod pacijenta br. 20 je uočena USM po tipu zajedničkog arterijskog stabla uz ASD i VSD, niže usađene aurikule, hipoplazija mandibule, manja usta, naglašen frontalni region lica i brazda četiri prsta obostrano. Kod pacijenta br. 21 je utvrđeno prisustvo VSD i ASD, facijalne dismorfije (mala usta, hipoplastična mandibula, koso čelo), hipokalcemije, rascepa nepca i makrocefalije. Pacijent br. 28 je imao zajedničko arterijsko stablo, ASD i VSD, bez utvrđene facijalne dismorfije i dodatnih ekstrakardijalnih malformacija. Pacijent br. 43 je imao dijagnostikovano prekid aortnog luka tip B, manja usta, naglašen nosni greben, ekvinovarus deformitet stopala i hipokalcemiju, a kod pacijenta br. 57 je utvrđena atrezija plućne arterije, VSD, hipoplazija mandibule, hipokalcemija i konvulzije. Kod pacijenta br. 66 je detektovano prekid aortnog luka tip C sa VSD, kao i facijalna dismorfija karakteristična za 22q11.2 delecioni sindrom, dok je kod pacijenta br. 95 detektovano prekid aortnog luka, ASD i VSD, blaga facijalna dismorfija i hipokalcemija.

Podaci iz literature ukazuju da je delecija regiona 22q11.2 najčešća CNV koja se dovodi u vezu sa nastankom USM i to pre svega konotrunkalnih USM, koje su prisutne kod 70% obolelih sa ovom mikrodelecijom. Od konotrunkalnih USM, kod pacijenata sa detektovanom delecijom su najčešće prisutne: prekid aortnog luka (22-48%), zajednički trunkus (12-35%) i TOF (8-13%) (Pierpont *et al.*, 2018). Pored konotrunkalnih USM često se javlja i VSD koji se sreće kod 23% pacijenata (McDonald-McGinn *et al.*, 2020). U našoj studiji, među ispitanicima sa detektovanom delecijom 22q11.2 njih sedmero (7/9) je imalo konotrunkalne USM, jedan ispitanik (1/9) je imao septalni defekt, a jedan ispitanik (1/9) imao kombinaciju RVTO i septalnog defekta (Tabela 6), što je u skladu sa literaturnim podacima.

Region 22q11.2 se sastoji od 8 LCR regiona i kao takav je sklon procesu nealelske homologe rekombinacije što rezultuje nastankom delecija različitih veličina među kojima su

najčešće: delecija veličine 3 Mb (tipični deletirani region ograničen LCRA-LCRD regionima) i delecija veličine 1,5 Mb (ograničena LCRA-LCRB i 2MB (LCRA-C) što je shematski prikazano na Slici 12 (Rozas *et al.*, 2019).



Slika 12. Shematski prikaz hromozomskog regiona 22q11.2. Preuzeto od (Rozas *et al.*, 2019).

Tipični deletirani region od 3 Mb sadrži 106 gena među kojima su: 46 protein kodirajućih, 26 pseudogena, 7 gena za miRNK, 12 gena za lncRNK, 2 gena za male nukleolarne RNK (snoRNK), kao i drugi geni čija funkcija još uvek nije razjašnjena (Du *et al.*, 2020). Među najznačajnijim genima koji se povezuje sa kliničkim manifestacijama jeste *TBX1* gen, čiji proteinski produkt ima ulogu transkripcionog faktora koji reguliše ekspresiju velikog broja gena. Studije na miševima su pokazale da inaktivacija jednog alela *TBX1* gena dovodi do USM, a inaktivacija oba alela dovodi do rascepa nepca, aplazije timusa i paratiroidne žlezde. Takođe, pokazano je da se ovaj gen eksprimira u različitim organima, što govori o njegovoj značajnoj ulozi u nastanku kliničkih manifestacija uzrokovanih delecijom 22q11.2 (Morrow *et al.*, 2018). Pored *TBX1* gena, u literaturi se kao značajni za nastanak kliničkih manifestacija opisuju i drugi geni iz ovog regiona: *CRKL2* (OMIM 603442), *DGCR8* (OMIM 609030), *HIRA* (OMIM 600237), *COMT* (OMIM 116790), *PRODH* (OMIM 606810) i dr. *CRKL2* gen se nalazi u LCR22C-D regionu, a proteinski produkt ovog gena je citoplazmatični adaptorni protein koji je uključen u signalne puteve faktora rasta. *CRKL2* protein je neophodan za razvoj timusa, paratiroidne žlezde, aortnog stabla i srca. Dodatno, istraživanja su pokazala da *CRKL2* gen ima ulogu u embrionolanom razviću urogenitalnih organa i bubrega (McDonald-McGinn *et al.*, 2015). miRNK koje su kodirane genima u regionu 22q11.2 regulišu ekspresiju gena koji kontrolišu razviće srca i mozga. *DGCR8* gen nosi informaciju za sintezu proteina koji učestvuje u obradi miRNK. *HIRA* gen kodira za komponentu proteinskog kompleksa koja pozicionira varijantu H3 histona u nukleozome i na taj način moduliše gensku ekspresiju preko modifikacije hromatina (Tang *et al.*, 2006). U regionu 22q11.2 nalazi se i veliki broj gena koji imaju funkciju u razviću mozga ili imaju značajnu ulogu u procesu ponašanja. *COMT* gen čiji proteinski produkt katehol-O-metiltransferaza ima ključnu ulogu u metabolizmu neurotransmitera dopamina. Dok su neke studije pokazale da redukovana aktivnost *COMT* enzima dovodi do kognitivnog/bihevioralnog defekta, međutim neke druge studije to nisu potvrdile, tako da je uloga ovog gena i dalje kontroverzna (Morrow *et al.*, 2018). *PRODH* gen kodira za prolin dehidrogenzu koja konvertuje prolin u glutamat koji je dalje uključen u neurotransmisiju (Philip

*et al.*, 2011). *PIK4CA* gen kodira za  $\alpha$  fosfatidili inozitol kinazu i jedan je od kandidatnih gena za nastanak shizofrenije (Ikeda *et al.*, 2010; Vorstman *et al.*, 2009). Delecija veličine od 1,5 Mb koja obuhvata LCRA-LCRB segment (Slika 12) obuhvata 30 protein kodirajućih gena među kojima je i *TBX1* gen, kao i 6 gena za miRNK i 9 gena za lncRNK, čija je haploinsuficijencija zabeležena i u okviru klasičnog deletiranog regiona od 3 Mb (Slika 12) (Du *et al.*, 2020).

Na osnovu rezultata dobijenih primenom P250 MLPA kita, u našoj studiji procenjeno je da je kod osam ispitanika detektovana delecija u regionu 22q11.2 veličine 3 Mb, dok je kod jednog ispitanika detektovana delecija veličine 1,5 Mb. Literaturni podaci ukazuju da klinička slika pacijenata nije zavisna od veličine detektovane delecije (McDonald-McGinn *et al.*, 2015). Fenotipska varijabilnost 22q11.2 delecionog sindroma, se objašnjava uticajem različitih genomskih sekvenci koje se nalaze kako u okviru samog regiona 22q11.2 tako i izvan njega. Naime, *TBX1* gen koji se opisuje kao glavni kandidatni gen za pojavu različitih kliničkih manifestacija, se eksprimira u specifičnim delovima faringealnog regiona tokom embrionalnog razvića, kao i u srčanim progenitorskim ćelijama drugog srčanog polja, regulišući ekspresiju oko 2000 gena (Du *et al.*, 2020). Istraživanja su pokazala da proteinski produkt *TBX1* gena interaguje sa KMT2 familijom histonskih metiltransferaza, koje aktiviraju proces transkripcije preko metilacije lizinskih rezidua histona H3 u hromatinu. Stoga se pretpostavlja se da TBX1-KMT2 kompleks reguliše transkripciju oko 1000 gena (Fulcoli *et al.*, 2016). Dodatno TBX1 interaguje sa SWI-SNAF-Like-BAF-proteinskim kompleksom koji takođe ima ulogu u remodelovanju hromatina (Chen *et al.*, 2012). Primeri samo ove dve interakcije koje ostavlja TBX1 protein ukazuju da male fluktuacije u *TBX1* ekspresiji mogu dalje uzrokovati promene u ekspresiji na hiljade transkripata, što posledično može da dovede do različitih malformacija organa koji nastaju od faringealnog regiona. Sa druge strane, pokazano je da *DGCR6* gen koji se nalazi u okviru klasičnog deletiranog 22q11.2 regiona, negativno reguliše ekspresiju *TBX1* gena što utiče na proces migracije ćelija nervnog grebena duž faringealnog regiona. Ćelije nervnog grebena u toku procesa embriogeneze uspostavljaju vaskulaturu duž faringealnog regiona, te promene u njihovoj lokaciji takođe mogu uticati na morfogenezu ovog regiona (Chakraborty *et al.*, 2012). Zanimljivo je da je kod pacijenata sa delecijom regiona 22q11.2 nivo ekspresije *DGCR6* transkripata varijabilan. Uprkos prisustvu delecije regiona 22q11.2, pojedini pacijenti imaju veći nivo ovih transkripata u odnosu na normalne kontrole. Ova pojava se može objasniti epigenetičkim uticajem, s obzirom da nema dokaza o postojanju maternalnog/paternalnog imprintinga. Takođe, značajna je i interakcija *DGCR6* i *PRODH* gena. Pokazano je da delecije ili duplikacije *DGCR6* gena u kombinaciji sa *PRODH* genom uzrokuju nastanak USM (Du *et al.*, 2020). Pored uloge proteinskog produkta *TBX1* gena u jedru ćelije gde reguliše proces transkripcije velikog broja gena, ovaj protein ima svoju funkciju i u ćelijskoj citoplazmi gde formira kompleks sa SMAD1 proteinom i na taj način onemogućava SMAD1 protein da interaguje sa SMAD4 proteinom (Fulcoli *et al.*, 2009). SMAD1-SMAD4 kompleks aktivira BMP signlni put, koji ima ključnu ulogu u septaciji i remodelovanju arterijskih lukova, morfogenezi timusa i paratireodnih žlezda (Liu *et al.* 2004; Gordon *et al.*, 2008). Pored *TBX1* gena drugi ključni faktor koji utiče na težinu kliničkih manifestacija 22q11.2 delecionog sindroma je *DGCR8* gen. Proteinski produkt ovog gena je neophodan u biogenezi miRNK koje svoju funkciju ostvarju tako što destabilizuju molekule iRNK koji nose informacije za sintezu proteina ili reprimiraju proces translacije. Smanjena ekspresija *DGCR8* gena, uzrokovana delecijom u regionu 22q11.2, može da uzrokuje smanjenu sintezu na hiljade transkripata (Du *et al.*, 2020). U skladu sa tim, pokazano je da je u perifernoj krvi pacijenata sa delecijom regiona 22q11.2 detektovan varijabilan nivo miRNK (De La Morena *et al.*, 2013; Sellier *et al.*, 2014).



Eksperimenti sprovedeni na miševima su takođe pokazali da haploinsuficijencija *Dgcr8* dovodi do smanjene ekspresije miRNA u neuronima što za posledicu može imati abnormalanu signalizaciju posredovanu kalcijumom u hipokampalnim neuronima i prevremeno oslobađanje neurotransmitera (Earls *et al.*, 2010; Earls *et al.*, 2012). Ovakve sinaptičke prezentacije su česte kod shizofrenije koja se opisuje kod pacijenta sa 22q11.2 delecionim sindromom (Xu *et al.*, 2013). Literaturni podaci ukazuju i na značaj haploinsuficijencije gena za miRNK (MiR-185, MiR-1306 i MiR3618) koji se nalaze u okviru deletrirang regiona 22q11.2. (Du *et al.*, 2020). MiR-185 se eksprimira u srčanom tkivu, ćelijama imunog sistema i mozgu, a čiji target predstavljaju transkripti koji su od značaja za signalizaciju kalcijuma (Kim *et al.*, 2015). MiR-649 targetuje MALT1 komponentu kompleksa koji aktivira Nf-kB u limfocitima (Zhang *et al.*, 2017). MiR-1306 targetuje receptor za TGF molekul koji ima ulogu u TGFβ signalnom putu (Yang *et al.*, 2019) i na taj način može da moduliše procese u kojima je ovaj signalni put aktivan. Imajući u vidu navedene literaturne podatke može se pretpostaviti da u osnovi varijabilne kliničke slike naših ispitanika mogu biti različite alteracije u genskoj ekspresiji u različitim tkivima uzrokovane haploinsuficijencijom gena deletiranog regiona, kao i kompleksne interakcije proteinskih produkata i transkripata ovih gena sa drugim genima koji ostvaruju svoje uloge tokom embriogeneze, uticaji gena modifikatora i različitih sekvenci izvan regiona 22q11.2, epigenetički i sredinski faktori.

Delecija 22q11.2 u najvećem broju slučajeva (95%) nastaje *de novo*, a u malom procentu (5%) je nasleđena od roditelja (Morrow *et al.*, 2018). U našoj studiji segregacione studije su urađene za tri pacijenta gde su roditelji bili zainteresovani/dostupni za testiranje. Kod dvoje ispitanika je utvrđeno da je detektovana delecija 22q11.2 nastala *de novo* ili, manje verovatno usled germinativnog mozaicizma kod jednog od roditelja, s obzirom da nije utvrđeno njeno prisustvo u DNK periferne krvi ni kod jednog od roditelja. Kod jednog ispitanika (pacijent br.20) utvrđeno je da je detektovana delecija maternalnog porekla.

Pored delecije regiona 22q11.2, među patološkim rezultatima detektovanim MLPA analizom, kod jednog pacijenta je primenom P311 MLPA kita detektovana delecija regiona 3p25 (pacijent br. 90). Kod ovog novorođenčeta je utvrđeno prisustvo kompleksne USM koju su činile VSD i koarktacija aorte. Dismorfološkim pregledom je konstatovano prisustvo šireg i ugnutog korena nosa, tanke gornje usne i hipoplastične mandibule. U cilju potvrde detektovane delecije kao i u cilju procene njene veličine nakon MLPA analize urađen je aCGH. Primenom ove analize detektovana je intersticijalna delecija veličine oko 5,57 Mb koja zahvata 3p26.1.p25.3 region. Deletirani hromozomski region sadrži 45 gena, među kojima su i oni koji se povezuju sa fenotipom. Među njima, najznačajniji su: *CAV3* (OMIM 601253) i *CRELD1* (OMIM 607170) gen koji su povezani sa srčanim defektima, kao i *SETD5* (OMIM 615743) i *BRPF1* (OMIM 602410) gen koji su povezani sa kašnjenjem u razvoju. U literaturi su opisane terminalne i intersticijalne delecije u 3p regionu različite veličine koje uzrokuju 3 pter-p25 delecioni sindrom koji se još označava kao 3p- sindrom (OMIM 613792). Ovaj sindrom se karakteriše varijabilnim fenotipom koji uključuje sledeće manifestacije: kašnjenje u rastu i razvoju, intelektualne poteškoće, trigonocefaliju, malu porođajnu masu, facijalnu dismorfiju (sinofris, hipertelorizam, blefaroptoza, zaravnjen nosni greben), postaksijalnu polidaktiliju, anomalije bubrega, rascep nepca i USM (najčešće atrioventrikularni septalni defekt) (Shuib *et al.*, 2009; Cuoco *et al.*, 2011). U DECIPHER bazi prijavljena su dva pacijenta sa delecijama koje se delimično preklapaju sa detektovanom delecijom kod našeg ispitanika. Kod jednog od ova dva prijavljena pacijenta je detektovana *de novo* intersticijalna delecija veličine 4,79 Mb, a od kliničkih manifestacija kod ovog ispitanika je uočeno prisustvo USM, facijalna dismorfija i

nenapredovanje u težini. Kod drugog pacijenta sa niskim rastom, trigonocefalijom, intelektualnim poteškoćama i epilepsijom je detektovana intersticijalna delecija veličine 3,95 Mb, pri čemu nisu prijavljene informacije o rezultatima segregacionih analiza kod roditelja. Imajući u vidu navedene informacije, klinička slika našeg ispitanika je u skladu sa literaturnim podacima o fenotipu uzrokovanom delecijom 3p26.1.p25.3 regiona.

Nakon sprovedene MLPA analize, kod ispitanika sa normalnim MLPA rezultatima primenjena su dodatna genetička testiranja. U prvom koraku dodatnih testiranja urađen je hromozomski *microarray*, a potom u slučaju dobijanja normalnog rezultata urađeno je i sekvenciranje „kliničkog egzoma“. Ovakav metodološki pristup imao je za cilj dodatnu detekciju genomskih alteracija koje uzrokuju nastanak USM ili njihovu bolju karakterizaciju.

Analiza hromozomski *microarray* je rađena primenom 60K aCGH tehnologije, a utvrđena stopa detekcije patogenih i verovatno patogenih CNV kod neselektovane novorođenčadi sa kritičnim USM i normalnim rezultatima MLPA analize, iznosi 11,54% (3/26). U prethodno objavljenim studijama koje su imale za cilj detekciju CNV pomoću *array* tehnologije u pedijatrijskoj populaciji ispitanika sa USM, primenjivane su različite *array* platforme kod različitih kohorti ispitanika, a stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih CNV je iznosila od 4,37% do 67,3% (Geng *et al.*, 2014; Syrmou *et al.*, 2013).

U studiji koju su sproveli Syrmou i saradnici detekcija CNV je rađena kod 55 pacijenta sa USM i najmanje jednim dodatnim kliničkim znakom koji upućuje na hromozomsku abnormalnost. *Array* analiza je rađena primenom 244K i 4x180K platformi, koje su četiri odnosno tri puta veće rezolucije u odnosu na rezoluciju platforme koju smo mi primenjivali, pri čemu je kod 37/55 (67,3%) ispitanika utvrđeno prisustvo CNV. Među ispitanicima sa detektovanim CNV njih 29/37 (78,4%) je imalo detektovane CNV koje se dovode u vezu sa nastankom USM (Syrmou *et al.*, 2013). Geng i saradnici su *array* tehnologiju baziranu na primeni 244K, 4x180K, SNP+CGH *Affymetrix HD array* platformi primenili kod 514 ispitanika sa sindromskim i nesindromskim tipovima USM. Stopa detekcije patogenih CNV kod ispitanika sa izolovanim USM je iznosila 4,37%, a stopa detekcije patogenih i verovatno patogenih CNV 9,3%. Stopa detekcije patogenih varijanti među ispitanicima sa sindromskim USM je iznosila 14,17%, dok je stopa detekcije patogenih i verovatno patogenih varijanti iznosila 20,6% (Geng *et al.*, 2014). Primenom hromozomskog *microarray*-a Molck i saradnici su detektovali CNV kod 78 ispitanika sa USM i ekstrakardijalnim anomalijama kod kojih je prethodno FISH/MLPA analizom isključeno prisustvo delecije regiona 22q11.2. Hromozomski *microarray* je rađen uz pomoć visokorezolucione platforme *Affymetrix HD Chip*, a stopa detekcije patogenih CNV je iznosila 10% (Molck *et al.*, 2016). Buckley i saradnici su retrospektivno analizirali stopu detekcije genomskih abnormalnosti kod 537 odojčadi sa USM kojima je rađena kardiohirurška operacija tokom prve godine života, primenom analize kariotipa, FISH analize (primenom proba za hromozomske regione 22q11.2 i 7q11.23) i *array* analize. Analiza kariotipa je urađena kod 33% ispitanika, FISH analiza kod 21%, a *array* kod 31% ispitanika, pri čemu je kod 56% ispitanika istovremeno urađeno više genetičkih analiza. *Array* analiza je rađena pomoću platforme koja sadrži 800 000 proba, što je 13 puta više nego platforma koju smo mi koristili, a stopa detekcije patogenih CNV je iznosila 14% (Buckley *et al.*, 2014). Bachman i saradnici su kod 46 odojčadi sa USM hospitalizovane na Odeljenju intenzivne nege primenom *array* tehnologije (135K *array* platforma) patogene varijante detektovali kod 26,1% ispitanika (Bachman *et al.*, 2013). Thienpont i saradnici su kod 60 pacijenta sa USM, ekstrakardijalnim

malformacijama i fenotipom koji ukazuje na hromozomske aberacije primenom 1 M array platforme visoke rezolucije detektovali CNV koje nisu prisutne u zdravoj populaciji kod 30% ispitanika (Thienpont *et al.*, 2007). Shanshen i saradnici su retrospektivno analizirali stopu detekcije patogenih varijanti kod odojčadi sa USM kod kojih je urađen SNP *array* visoke rezolucije. U istraživanje je uključeno 297 ispitanika, a stopa detekcije patogenih i VUS varijanti je 25,6% (Shanshen *et al.*, 2018). Wu i saradnici su kod 164 pacijenata sa USM sa ili bez dodatnih anomalija, koji su imali normalan rezultat kariotipa primenom *array* tehnologije visoke rezolucije, patogene varijante detektovali kod 27,9% ispitanika, a VUS varijante kod 2,9% ispitanika. Stopa detekcije patogenih varijanti kod ispitanika sa nesindromskim USM je iznosila 17,9%, a kod ispitanika sa sindromskim USM 33,8% (Wu *et al.*, 2017). S obzirom da su sve prethodno objavljene studije imale drugačiji dizajn od naše, direktno poređenje dobijene stope detekcije CNV primenom hromozomskog *microarray*-a u našoj studiji sa literaturnim podacima nije moguće. Ipak, naši rezultati ukazuju da i primena 60K *array* platforme koja je znatno niže rezolucije od rezolucija platformi koje su primenjivane u objavljenim studijama može da bude dobar izbor za primenu kod pacijenata sa kritičnim USM.

Nakon detekcije CNV primenom aCGH urađena je karakterizacija identifikovanih varijanti. Kod ispitanika br. 29 kod koga je utvrđeno prisustvo kritične stenoze plućne arterije, male porođajne mase, ugnutog korena nosa i mikrocefalije, primenom aCGH je detektovana intersticijalna delecija od oko 970 Kb u regionu 11q14.2, okarakterisana kao verovatno patogena (Tabela 7). Deletirani region sadrži tri gena, među kojima je najznačajniji *FZD4* gen koji u haploinsuficijenciji može da dovede do oftalmološkog oboljenja eksudativne vitreoretinopatije. Pretragom OMIM baze nije uočeno prisustvo kandidatnog gena odgovornog za nastanak USM. Pretragom DECIPHER i ClinVar baza nisu nađeni pacijenti sa detektovanim komparabilnim hromozomskim rearanžmanom. Pored detektovane delecije na q kraku hromozoma 11 kod ispitanika br. 29 je utvrđeno i prisustvo kompleksnog hromozomskog rearanžmana koji se sastoji od tri vezane delecije u regionu 8q11.23q12.1. ukupne veličine oko 4,5 Mb okarakterisane kao VUS. Ovaj region sadrži više od 20 gena, među kojima nema onih koji se povezuju sa kliničkom slikom našeg ispitanika. Međutim, njihov aditivni/modifikujući efekat na fenotip se ne može isključiti. Segregacione analize su pokazale da nijedna varijanta nije prisutna kod roditelja, što govori u prilog njihovom *de novo* nastanku.

aCGH tehnologijom kod ispitanika br. 38 je utvrđeno prisustvo tri hromozomska rearanžmana od kojih je najznačajnija intersticijalna delecija 5q21.3-q23.1 veličine oko 10,5 Mb, koja je okarakterisana kao patogena. Pored navedene delecije detektovane su i dve manje duplikacije u regionu 3p26 okarakterisane kao VUS. U kliničkoj slici ispitanika br. 38 zabeleženo je prisustvo TOF, atrezije anusa, nespuštenih testisa i blage facijalne dismorfije. Detektovana intersticijalna delecija na dugom kraku hromozoma 5 obuhvata veliki broj gena među kojima prema dosadašnjim naučnim saznanjima nema onih koji se jasno dovode u vezu sa nastankom USM. Među najznačajnijim genima koji se nalaze u deletiranom regionu su *APC* gen (OMIM 611731) i *MCC* gen (OMIM 159350). *APC* gen se povezuje sa familijarnom adenomatoznom polipozom (FAP), koja se karakteriše razvojem velikog broja adenomatoznih polipa na kolonu koji se u proseku javljaju oko 15. godine života i koji predstavljaju prekancerske lezije. Pored kancera kolona, defekti *APC* gena mogu da uzrokuju i nastanak osteoma ili tumore mekih tkiva (Leoz *et al.*, 2015). *MCC* gen se takođe dovodi u vezu sa malignitetima (Edwards *et al.*, 2014). U literaturi se opisuju intersticijalne delecije dugog kraka hromozoma 5 koje nisu identične sa delecijom detektovanom kod našeg ispitanika, a koje zahvataju *APC* gen, kod pacijenata sa FAP-om, intelektualnim poteškoćama, senzorineuralnom

nagluvošću a retko i sa srčanim defektima (Heald *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007; Casper *et al* 2014; Jones *et al.*, 2010). Pretragom DECIPHER i ClinVar baza nije pronađen nijedan prijavljeni pacijent sa detektovanim hromozomskim rearanžmanom kao kod našeg ispitanika. Detektovane 3p26 duplikacije obuhvataju više gena, među kojima je najznačajniji *CNTN4* (OMIM 607280) gen. Delecije i intragenske mutacije ovog gena se dovode u vezu sa neurorazvojnim poteškoćama, dok kliničke manifestacije uzrokovane duplikacijom ovog gena nisu opisane u literaturi, ali se njihov aditivni/modifikujući efekat na fenotip ne može isključiti. Zbog smrti majke ispitanika, koja je preminula pre pristizanja rezultata aCGH novorođenčeta, segregacione analize kod roditelja nisu urađene. Dodatnom kliničkom evaluacijom članova porodice, utvrđeno je da je kod majke ispitanika postajala sumnja na tumor u abdomenu i više izvesnih potkožnih tvorevina u ramenom pojasu.

Kod ispitanika br.71 koji je imao kombinovanu USM (perimembranozni VSD i ASD), abnormalan apgar skor na rođenju, suspektnu makrokraniju, brazdu četiri prsta i hipolaziju mandibule detektovana je terminalna patogena delecija ~ 4,94 Mb koja sadrži oko 90 gena. Među ovim genima nalazi se i *NSDI* gen čija haploinsuficijencija uzrokuje nastanak Sotos sindroma (OMIM 17550) koji se karakteriše: širokim čelom, proređenom kosom, izduženim licem, intelektualnim poteškoćama, prekomernim rastom, USM, makrokranijom, hiperelastičnim zglobovima, neonatalnom hipotonijom, anomalijama bubrega, skoliozom i epilepsijom što je u skladu sa kliničkom slikom našeg ispitanika (Leventopoulos *et al.*, 2009). Dodatno, detektovana delecija obuhvata region veličine od oko 3,5 Mb koji uzrokuje 5q subtelomerni sindrom koji se karakteriše prenatalnim/neonatalnim limfoedemom uz povećani nihalni nabor, kraćim vratom, hipotonijom, minor dismorfizmima i USM. U literaturi se delecija *NSDI* gena i subtelomerna delecija 5q35.3 regiona opisuje kao udruženi fenotip ova dva entiteta (Rauch *et al.*, 2003; Rauch *et al.*, 2007). Proteinski produkt *NSDI* gena ima ulogu transkripcionog kofaktora koji svoje dejstvo ostvaruje u različitim tkivima. U literaturi se delecije *NSDI* gena povezuju sa nastankom USM, tako da se detektovana delecija kod našeg ispitanika može smatrati uzročnom (Fagali *et al.*, 2009).

Pored patogenih/verovatno patogenih varijanti primenom aCGH tehnologije kod 4/26 (15,38%) ispitanika su detektovane VUS varijante (Tabela 7). Iako se u okviru detektovanih varijanti ne nalaze geni koji bi se mogli povezati sa nastankom USM i ostalih kliničkih manifestacija zabeleženih kod naših ispitanika, njihov aditivni efekat na fenotip se ne može isključiti.

Kod pet pacijenata kod kojih MLPA analizom i hromozomskim *microarray*-om nisu nađene uzročne varijante, urađeno je sekvenciranje „kliničkog egzoma“. Kod tri od pet testiranih pacijenata su detektovane uzročne varijante (Tabela 8).

Kod ispitanika br. 33 je utvrđeno prisustvo patogene homozigotne varijante c.1063C>T u *BBS12* genu (OMIM 610683). Patogene homozigotne ili udružene heterozigotne varijante u *BBS12* genu uzrokuju Bardet-Biedl sindrom tip 12, čije su osnovne manifestacije: razvojne i intelektualne poteškoće, kašnjenje u longitudinalnom rastu sa razvojem gojaznosti polidaktilija, distrofija konusnih štapića mrežnjače, malformacije bubrega i urogenitalnog trakta (Forsythe and Beales, 2013). Ovaj multisistemski poremećaj pripada grupi bolesti koje se nazivaju ciliopatije, uzrokovanim defektima u primarnim cilijama (nepokretnim cilijama) koje imaju ulogu u percepciji signala i ćelijskoj signalizaciji. Postoje različite varijante Bardet-Biedle sindroma uzrokovane defektima u različitim genima (*BBS1-BBS20*) (Priya *et al.*, 2010). BBS proteini (1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 i 18) učestvuju u formiranju BBS kompleksa koji ima ulogu nosača u antero i

retrogradnom transportu kroz ciliju. Formiranje BBS kompleksa se odigrava zahvaljujući BBS šaperonin kompleksa, koga čine BBS6, BBS10, BBS12 i BBS7 protein. Ostali BBS proteini ostvaruju svoje funkcije samostalno u bazi cilija ili u centrozomu, regrutujući BBS kompleks (Marion *et al.*, 2012). Istraživanja sprovedena na miševima su pokazala da BBS proteini preko Shh signalnog puta mogu imati uticaja na formiranje ekstremiteta. Shh signalni put se aktivira preko Ptch1 i Smo proteina koji interaguju sa BBS1 proteinom iz BBS kompleksa. Gubitak Bbs gena kod miševa rezultuje akumuliranjem Ptch1 i Smo proteina što može da dovede do smanjenog Shh odgovora, što dalje za posledicu može imati nastanak polidaktilije koja je jedna od osnovnih karakteristika Bardet-Biedl sindroma (Zhang *et al.*, 2012). Prema literarnim podacima, među kliničkim manifestacijama koje prate Bardet-Biedl sindrom su i USM. Među njima najčešće su one koje prate poremećaj lateralnosti, kao što su AVSD i vaskularne anomalije (Niederlova *et al.*, 2019). U kliničkoj slici našeg ispitanika, zabeleženo je prisustvo VSD i postaksijalne polidaktilije na šakama. Detektovana varijanta je prethodno opisana kod pacijenata sa sličnim kliničkim simptomima. Segregacione studije su pokazale da su roditelji heterozigotni nosioci detektovane varijante, što je u skladu sa obrascem nasleđivanja. Imajući u vidu navedene informacije, detektovana varijanta kod našeg ispitanika se može smatrati uzročnom. Rezultati sprovedenog genetičkog testiranja su doprineli ranom postavljanju dijagnoze Bardet-Biedl sindroma, što je obično otežano samo na osnovu kliničke slike novorođenčeta, jer se većina kliničkih manifestacija koje prate ovaj sindrom ispoljavaju u periodu kasnog detinjstva i rane adolescencije.

Primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ kod ispitanika br. 59 su identifikovane dve varijante c.11666C>G i c.308dupT u *DNAH9* genu koje uzrokuju primarnu cilijarnu diskineziju (Loges *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2022). Ovaj poremećaj nastaje kao posledica defekata na nivou pokretnih cilija (Lucas *et al.*, 2014). Pokretne cilije su građene na sličan način kao i nepokretne. Sastoje se od devet parova mikrotubula raspoređenih u obliku prstena, ali za razliku od nepokretnih, čiji defekti između ostalog dovode do prethodno opisanog Bardet-Biedl sindroma, pokretne cilije imaju još jedan centralni par mikrotubula koji je pozicioniran u centru prstena koji ima funkciju u procesu kretanja. Pored ovog centralnog para mikrotubula u građi pokretnih cilija učestvuje i dineinski kompleks proteina, koji ima ATPaznu funkciju, obezbeđujući energiju za kretanje i na taj način predstavlja molekularni motor cilija (Porter *et al.*, 2000). Dineinski kompleks se sastoji iz centralnog dela i dva para ručica, označenih kao unutrašnje i spoljašnje, preko kojih ostvaruje veze sa mikrotubularnim prstenom. Spoljašnje dinenske ručice su građene od DNAH5, DNAH11 i DNAH9 proteina kao i drugih proteina koji još nisu dovoljno istraženi, ali za koje se smatra da imaju ulogu u patogenezi primarne cilijarne diskinezije (Fliegeauf *et al.*, 2005; Dougherty *et al.*, 2016). Defekti koji onemogućuju pokretljivost cilija se mogu manifestovati na nivou različitih organskih sistema. Poremećaj u pokretljivosti cilija respiratornog epitela gornjih i donjih respiratornih puteva može dovesti do hronične inflamacije koja može da progredira do destruktivnih respiratornih oboljenja (bronhiektazija). Disfunkcija u pokretljivosti ćelija epitela Falopijeve tube i spermatozoida može dovesti do infertiliteta (Priya *et al.*, 2016). Takođe, defekti u pokretljivosti cilija mogu dovesti do poremećaja levo-desne orijentacije i pozicioniranja organa tokom embrionalnog razvića odnosno lateralnih defekata (Kennedy *et al.*, 2014). Detektovane varijante u *DNAH9* genu našeg ispitanika su po prvi put opisane u literaturi, te su stoga i funkcionalno okarakterisane u okviru internacionalne studije koja je imala za cilj da utvrdi ulogu *DNAH9* gena u nastanku primarne cilijarne diskinezije (Loges *et al.*, 2018). U kliničkoj slici ispitanika br. 59 je utvrđeno prisustvo neoperabilne kompleksne srčane mane u osnovi koje je situs ambiguus i levi atrijalni izomerizam. Segregacione

studije su pokazale da je varijanta c.11666C>G nasleđena od oca dok je druga varijanta c.308dupT nasleđena od majke, što ukazuje da je proband udruženi heterozigot za pomenute varijante. Istraživanja sprovedena na životinjama su pokazala da defekti u *DNAH9* genu dovode do poremećaja lateralnosti, defekata u cilijama i poremećaja u procesu uvijanja srca tokom embrionalnog razvića. Takođe, Chen i saradnici (Chen *et al.*, 2022) su na osnovu rezultata funkcionalnih studija pokazali da bialelne varijante u *DNAH9* genu uzrokuju nastanak kompleksnih USM nastalih kao posledica defekata u cilijama. Imajući u vidu da je klinička slika našeg ispitanika u skladu sa literaturnim podacima, detektovane varijante se mogu smatrati uzročnim.

Sekvenciranjem „kliničkog egzoma“ kod pacijenta br. 44 je utvrđeno prisustvo heterozigotne verovatno patogene, *de novo* varijante, c.858dupTu *KMT2D* genu. Patogene heterozigotne varijante u *KMT2D* genu uzrokuju nastanak Kabuki sindroma tip 1 čije su osnovne kliničke manifestacije kašnjenje u razvoju, karakterističan izgled očiju i drugi facijalni dismorfizmi, hipertrioza i skolioza. Postavljanje kliničke dijagnoze Kabuki sindroma u prvim danima života je često izazov, s obzirom da se karakteristična facijalna dizmorfija obično detektuje kasnije tokom detinjstva. Stoga, primena molekularne dijagnostike može da olakša ovaj proces (Dentici *et al.*, 2015). Kod 75% pacijenta sa Kabuki sindromom detektuju se varijante u *KMT2D* genu, dok kod 5% pacijenta ovaj sindrom nastaje kao posledica defekata u *KDM6A* genu (Boniel *et al.*, 2021). *KMT2D* protein je histonska (H3) metiltransferaza koja metiluje H3 histone koji učestvuju u izgradnji histonskog kompleksa oko kojih je namotan DNK molekul i na taj način oslobađa DNK, čineći je dostupnom za prilaz transkripcione mašinerije neophodne za proces transkripcije gena. *KDM6A* protein je histonska demetilaza koja ima suprotno dejstvo, tako da ova dva proteina imaju komplementarne funkcije, a njihov efekat je značajan za proces diferencijacije ćelija tokom embriogeneze (Bjornsson *et al.*, 2014). S obzirom da je naš pacijent od kliničkih manifestacija imao DORV, VSD, ASD facijalnu dismorfiju, skeletne anomalije koje uključuju zbijeni rameno grudni pojas, urogenitalne anomalije, što sve odlikuje i Kabuki sindrom, detektovana varijanta se može smatrati verovatno uzročnom.

Pored detekcije i karakterizacije submikroskopskih genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritično teškim USM, ova studija je imala za cilj i analizu distribucije pojedinih tipova USM i nekardijalnih malformacija među ispitanicima sa patološkim rezultatima genetičkih testiranja. Statističkom obradom podataka nije utvrđena statistički značajna korelacija između detektovanih patogenih varijanti i tipova USM, pojave ekstrakardijalnih malformacija, prisustva kraniofacijalne dismorfije i letalnog ishoda ispitanika (Tabela 11). Na osnovu prisustva bar jedne major ekstrakardijalne malformacije, facijalne i/ili druge dismorfije ispitanici su klasifikovani u dve grupe. Jednu grupu su činili ispitanici sa sindromskim formama USM (68/92, 73,9% ispitanika), a drugu grupu su činili ispitanici sa nesindromskim formama USM (24/92, 26,09%). S obzirom da za osam ispitanika nije urađena dismorfološka evaluacija, ovi ispitanici nisu klasifikovani ni u jednu od pomenutih grupa. Prema našim saznanjima, u prethodno objavljenim istraživanjima koja su se bazirala na genetičkoj evaluaciji novorođenčadi sa USM nisu objavljeni podaci o broju ispitanika sa sindromskim i nesindromskim USM. U našoj studiji patološki rezultati sprovedenih genetičkih testiranja detektovani su kod 15/68 (22,06%) ispitanika sa sindromskim USM (kod 9/68 ispitanika patološki rezultat detektovan MLPA analizom, kod 4/68 aCGH analizom, a kod 2/68 primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“) (Tabela 9). U grupi sa nesindromskim USM, patološki rezultati su detektovani kod 2/24 (8,33%) ispitanika (1/24 ispitanika sa MLPA analizom i 1/24 primenom

sekvenciranja „kliničkog egzoma“). U skladu sa očekivanjima, u grupi ispitanika sa sindromskim USM zabeležen je veći procentualni udeo patoloških rezultata detektovanih MLPA analizom (13,23%) u odnosu na grupu ispitanika sa nesindromskim USM (4,17%) (Tabela 9). Zbog malog broja ispitanika kod kojih su urađena dodatna genetička testiranja, procentualni udeo patoloških rezultata detektovanih aCGH i sekvenciranjem „kliničkog egzoma“ među ispitanicima sa sindromskim i nesindromskim USM, nije moguće komentarisati.

Literaturni podaci ukazuju da ekstrakardijalne malformacije kod pacijenata sa kritičnim USM mogu biti povezane sa povećanom stopom morbiditeta i mortaliteta kod ove grupe pacijenata. Naime, u studiji Bakera i saradnika, koja se bazirala na utvrđivanju prisustva ekstrakardijalnih malformacija kod pacijenata sa kritičnim USM uzrastne starosti do godinu dana, je pokazano da u grupi prevremeno rođenih ispitanika postoji statistički značajna povećana verovatnoća za prisustvo anomalija bubrega kao i intrakranijalnih abnormalnosti. Dodatno, pokazano je da među pacijentima koji su imali intrakranijalne abnormalnosti, postoji povećan trend stope mortaliteta, ali statistička značajnost nije utvrđena (Baker *et al.*, 2012). Naša studija je imala za cilj da utvrdi da li kod novorođenčadi sa kritičnim USM postoji statistički značajna korelacija između detektovanih genomskih abnormalnosti i prisustva ekstrakardijalnih malformacija kao i letalnog ishoda ispitanika. Međutim, statističkom analizom nije utvrđena statistički značajna korelacija između pomenutih parametara. U literaturi se mogu naći još dva istraživanja sa ovakvim rezultatima. Buckley i saradnici su među odojčadima sa USM koja je zahtevala kardiohirurške intervencije u toku prve godine života, uočili povećan trend patoloških rezultata genetičkih testiranja (FISH, hromozomski *microarray*), u grupi pacijenata sa detektovanim ekstrakardijalnim malformacijama, ali statistički značajnu korelaciju nisu utvrdili (Buckley *et al.*, 2014). Takođe, Ahrens-Nicklas i saradnici nisu utvrdili statistički značajnu korelaciju između prisustva ekstrakardijalnih malformacija i prisustva genomskih abnormalnosti kod odojčadi sa USM hospitalizovane na kardiološkoj intenzivnoj nezi (Ahrens-Nicklas *et al.*, 2016).

Ranije sprovedene studije pokazuju da prisustvo facijalne dismorfije kod pacijenata sa USM povećava verovatnoću za postavljane genetičke dijagnoze. Ahrens-Nicklas i saradnici su u svojoj studiji utvrdili statistički značajnu korelaciju između prisustva facijalne dismorfije i stope detekcije genomskih abnormalnosti kod odojčadi sa USM hospitalizovane na kardiološkoj intenzivnoj nezi. Takođe, pokazali su da prisustvo facijalne dismorfije u njihovoj kohorti povećava verovatnoću za postavljanje genetičke dijagnoze sedam puta (Ahrens-Nicklas *et al.*, 2016). U našem istraživanju nije utvrđeno prisustvo statistički značajne korelacije između prisustva facijalnih dismorfizama i detektovanih varijanti primenom MLPA analize. Razlike u dobijenim rezultatima se mogu objasniti različitim metodološkim pristupima. Studija Ahrens-Nicklas i saradnika nije bila fokusirana samo na pacijente novorođenačkog uzrasta, već je uključila pacijente starosti do godinu dana, a uz to je i broj ispitanika bio veći u odnosu na našu kohortu. Zatim, njihova studija nije bila fokusirana samo na submikroskopske genomске abnormalnosti, već su analizirane i hromozomske abnormalnosti vidljive na nivou svetlosnog mikroskopa (trizomije hromozoma 21, 13 i 18 i druge vijabilne hromozomske alteracije), tako da su primenjivana i dodatna genetička testiranja za njihovu detekciju. Iako naši rezultati statističke analize nisu ukazali na prisustvo statistički značajne korelacije, treba imati u vidu da je dobijena granična p vrednost za korelaciju major kraniofacijalnih dismorfizama i patoloških rezultata MLPA analize ( $p=0,049$ ; 80% vs. 20%) (Tabela 11). Dobijena p vrednost se ne može smatrati statistički značajnom, jer je samo kod dvoje ispitanika koji su imali kraniofacijalne dismorfizame utvrđeno prisustvo patoloških rezultata MLPA analize. Ali, izračunata p vrednost ukazuje da

prisustvo kraniofacijalne dismorfije kod novorođenčadi sa kritičnim USM ima tendenciju da poveća verovatnoću za detekciju genomskih abnormalnosti. Za potvrdu ovakve pretpostavke bi trebalo uraditi istraživanje koje bi uključilo veći broj ispitanika.

Analizirajući tipove USM naših ispitanika, utvrđeno je da najveći broj njih (42%) ima konotrunkalne USM. U ovoj grupi ispitanika, kao i kod ispitanika sa septalnim defektima utvrđena je najveća stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih varijanti. Slični rezultati su dobijeni i u prethodno sprovedenim istraživanjima. U studiji koju su sprovedeli Ahrens-Nicklas i saradnici, ispitanici sa kontrunkulnim USM su takođe bili najbrojniji (47%). Najveći broj patoloških rezultata sprovedenih genetičkih testiranja je detektovan kod ispitanika sa septalnim defektima (Ahrens-Nicklas *et al.*, 2016). Buckley i saradnici su kod odojčadi koja su zahtevala kardiohirurške intervencije u toku prve godine života, najveći broj submiskroskopskih genomskih abnormalnosti detektovali kod ispitanika sa konotrunkalnim i septalnim defektima (Buckley *et al.*, 2014). Ipak, rezultati naše ali i prethodno objavljenih studija pokazuju da je visoka stopa detekcije patogenih varijanti i među drugim tipovima USM (Tabela 10). Zbog toga bi genetička ispitivanja trebalo sprovoditi kod sve novorođenčadi sa kritičnim USM.

Detaljna klinička evaluacija ispitanika, uključujući i procenu facijalne dismorfije, je jako važna i često omogućava postavljanje kliničkih dijagnoza pre primene genetičkih testova. Međutim intubacija pacijenata kao i druge komplikacije često otežavaju kliničku evaluaciju pacijenta, posebno novorođenčadi hospitalizovane na intenzivnim negama, što otežava i postavljanje dijagnoza. Stoga, primena genetičkih testova kod ove grupe pacijenata može biti od posebnog dijagnostičkog i praktičnog značaja. Među našim ispitanicima, pre primene MLPA analize, klinička dijagnoza 22q11.2 delecionog sindroma je postavljena kod sedam ispitanika. U daljem toku studije, primenom genetičkih testova dijagnoza je postavljena kod još devet novorođenčadi (kod troje pomoću MLPA analize, kod troje pomoću aCGH analize i kod troje primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“). S obzirom da novorođenčad sa kritičnim USM često zahteva kardiohirurške intervencije odmah nakon rođenja, brzo i efikasno postavljanje preciznih dijagnoza kod ove grupe pacijenta je od velikog značaja jer može imati uticaja na tretman i lečenje. Tako na primer, rano postavljanje dijagnoze 22q11.2 delecionog sindroma je značajno jer pacijenti mogu da razviju donor protiv domaćina (engl. *graft host disease*), ako se prilikom transfuzija krvi primenjuju neozračeni derivati krvi. Takođe, prethodna istraživanja su pokazala da kod ovih pacijenata postoji veći rizik za nastanak sepse i hipokalcemije (Cuturilo *et al.*, 2010). Dodatno, visoka stopa smrtnosti u ovoj populaciji pacijenata, koja je potvrđena i u našoj studiji (detektovan mortalitet tokom prve godine života 27,9%) ukazuje na značaj sprovođenja genetičkih testiranja u što ranijem periodu. Literaturni podaci pokazuju da su pacijenti sa USM i detektovanim CNV u većem riziku za nastanak neurorazvojnih poteškoća (Pierpont *et al* 2018; Geddes *et al.*, 2018) tako da kod ovih pacijenata treba što ranije započeti sa razvojnim stimulativnim tretmanima. Rezultati genetičkih testiranja mogu biti od značaja i za genetičko informisanje i sprovođenje prenatalne dijagnostike kod porodica obolelih. Tako, na osnovu rezultata genetičkog ispitivanja sprovedenog u ovom istraživanju, roditeljima četiri ispitanika su omogućena prenatalna testiranja u narednim trudnoćama, što je doprinelo obezbeđivanju zdravog potomstva.

Brzina i troškovi testiranja su bitni faktori koji utiču na primenu genetičkih testiranja. Pored visokih troškova aCGH analize, neretko problem pri sprovođenju ove analize predstavlja i vreme dobijanja rezultata, koje je obično značajno duže u odnosu na MLPA analizu. Vreme dobijanja rezultata aCGH analize je naročito dugo u slučajevima kada se aCGH ne radi u okviru



ustanova u kojima se pacijenti leče, što je praksa i u Srbiji. Stoga je ova studija imala za cilj da utvrdi da li MLPA analiza kao alternativna analiza za detekciju CNV na selektovanim hromozomskim regionima, može da se primenjuje kao test prvog izbora kod sve novorođenčadi sa kritično teškim urođenim srčanim manama hospitalizovane na odeljenjima intenzivne nege. Imajući u vidu visoku stopu detekcije genomske abnormalnosti koje su kod najvećeg broja naših ispitanika detektovane MLPA tehnologijom, rezultati ove studije ukazuju da se MLPA kao brza, senzitivna i ekonomski povoljna analiza može primenjivati kao test prvog izbora kod novorođenčadi sa kritičnim USM. Kako u Srbiji postoji mogućnost za izvođenje MLPA analize u okviru dva najveća pedijatrijska centra, koja ujedno predstavljaju i najveće centre za lečenje dece sa USM, sprovođenje ove analize kod sve novorođenčadi sa kritičnim USM bi moglo da doprinese unapređenju kvaliteta zdravstvene zaštite ovih pacijenata i njihovih porodica.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog istraživanja doneti su sledeći zaključci:

1. Kod novorođenčadi sa kritično teškim USM se mogu detektovati različite genomske abnormalnosti, što ukazuje na značaj genetičke evaluacije i primene različitih genetičkih testova kod ove grupe pacijenata.
2. Genetička testiranja mogu doprineti efikasnoj dijagnostici naročito kod novorođenčadi sa kritičnim USM kod kojih je klinička evaluacija često otežana. Primenom MLPA analize, aCGH i sekvenciranja „kliničkog egzoma“ genetička dijagnoza je postavljena kod 16/100 novorođenčadi: kod 10 novorođenčadi primenom MLPA analize, kod 3 novorođenčeta pomoću aCGH analize i kod 3 novorođenčeta primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“.
3. Stopa detekcije patogenih CNV primenom MLPA analize (P250 i P311 MLPA kitovi) kod novorođenčadi sa kritičnim USM je iznosila 10%. Kod najvećeg broja ispitanika (9/10) detektovana je delecija u regionu 22q11.2, dok je kod jednog ispitanika detektovana delecija u regionu 3p25.
4. Stopa detekcije patogenih/verovatno patogenih varijanti primenom aCGH analize kod ispitanika koji su imali normalne rezultate MLPA analize je iznosila 11,54% (3/26), dok je stopa detekcije VUS varijanti 15,38% (4/26).
5. Primenom sekvenciranja „kliničkog egzoma“ kod ispitanika koji su imali normalne rezultate MLPA i aCGH testiranja, patogene/verovatno patogene varijante su detektovane kod 3/5 (60%) ispitanika. Ovim testiranjem detektovane su varijante koje uzrokuju Bardet-Biedl sindrom tip 12, Kabuki sindrom i primarnu cilijarnu diskineziju.
6. Statističkom obradom podataka nije utvrđena statistički značajna korelacija između detektovanih genomskih abnormalnosti i tipova USM, pojave ekstrakardijalnih malformacija i nastanka smrtnog ishoda.
7. Najveći broj novorođenčadi hospitalizovane u jedinici intenzivne nege zbog kritično teških USM je imalo konotrunkalne USM (42/100, 42%). U ovoj grupi je detektovan i najveći broj patoloških rezultata genetičkih testiranja (9/16, 56,25%). Patološki rezultati sprovedenih genetičkih testiranja su detektovani kod 15/68 (22,06%) ispitanika sa sindromskim USM i kod 2/24 (8,33%) ispitanika sa nesindromskim USM.
8. Postignute stope detekcije uzročnih hromozomskih i genskih varijanti primenom različitih metoda ukazuju da se MLPA analiza može primenjivati kao inicijalni test u okviru genetičkog ispitivanja novorođenčadi sa kritično teškim USM.

## 7. LITERATURA

Al-Farqani A, Panduranga P, Al-Maskari S, Thomas E (2013). VACTERL association with double-chambered left ventricle: A rare occurrence. *Ann Pediatr Cardiol* 6(2):200-201.

Ahrens-Nicklas RC, Khan S, Garbarini J, Woyciechowski S, D' Alesandro L, Zackai EH, et al (2016). Utility of genetic evaluation i infants with congenital heart defects admitted to the cardiac Intensive care unit. *Am J Med Genet* 9999A:1-8.

Bachman KK, deWard SJ, Chzsostomou C, Munoy R, Madan Ketharpal S (2015). Array CGH a first tier test for neonates with congenital heart disease. *Cardiol Young* 25(1):115-122.

Baker K, Sanchez-de-Toledo J, Munoz R, Orr R, Kiray S, Shiderly D, et al (2012). Critical congenital heart disease--utility of routine screening for chromosomal and other extracardiac malformations. *Congenit Heart Dis* 7(2):145-150.

Battaglia A, Hoyme HE, Dallapiccola B, Zackai E, Hudgins L, McDonald-McGinn D, et al (2008). Further delineation of deletion 1p36 syndrome in 60 patients: a recognizable phenotype and common cause of developmental delay and mental retardation. *Pediatrics* 121(2):404-410.

Bauer RC, Laney AO, Smith R, Gerfen J, Morrissette JJ, Woyciechowski S, et al (2010). Jagged1 (JAG1) mutations in patients with tetralogy of Fallot or pulmonic stenosis. *Hum Mutat* 31(5):594-601.

Bean LJH, Funke B, Carlston CM, Gannon JL, Kantarci S, Krock BL, et al (2019). Diagnostic gene sequencing panels: from design to report-a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 22(3):453-461.

Behjati S, Tarpey PS (2013). What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 98(6):236-238.

Bernier R, Steinman KJ, Reilly B, Wallace AS, Sherr EH, Pojman N, et al (2016). Clinical phenotype of the recurrent 1q21.1 copy-number variant. *Genet Med* 18(4):341-349.

Bjornsson HT, Benjamin JS, Zhang L, Weissman J, Gerber EE, Chen YC, et al (2014). Histone deacetylase inhibition rescues structural and functional brain deficits in a mouse model of Kabuki syndrome. *Sci Transl Med*. 2014 6(256):256ra135.

Blue GM, Ip E, Walker K, Krik EP, Fr CPA F, Loughran-Fowalds A, et al (2018). Genetic burden and associations with adverse neurodevelopment in neonates with congenital heart disease. *Am heart J* 201:33-39.

Boniel S, Szymańska K, Śmigiel R, Szczaluba K (2021). Kabuki Syndrome-Clinical Review with Molecular Aspects. *Genes (Basel)* 12(4):468.

Botto LD, Lin AE, Riehle-Colarusso T, Malik S, Correa A; National Birth Defects Prevention Study (2007). Seeking causes: Classifying and evaluating congenital heart defects in etiologic studies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79(10):714-727.

Breckpot J, Thienpont B, Arens Y, Tranchevent LC, Vermeesch JR, Moreau Y, et al (2011). Challenges of interpreting copy number variation in syndromic and non-syndromic congenital heart defects. *Cytogenet Genome Res* 135(3-4):251-259.

Brunet A, Gabau E, Perich RM, Valdesoiro L, Brun C, Caballín MR, et al (2006). Microdeletion and microduplication 22q11.2 screening in 295 patients with clinical features of DiGeorge/Velocardiofacial syndrome. *Am J Med Genet A* 140(22):2426-32.

Buckley JR, Kavarana MN, Chowdhury SM, Scheurer MA (2014). Current practice and utility of Chromosome microarray analysis in infants undergoing cardiac surgery. *Congenit Heart Dis* 10:E131-e138.

Buno DL, Ganesamoorthy D, Schoumans J, Bankier A, Coman D, Dekatycki M, et al (2009). Detection of cryptic pathogenic copy number variations and constitutional loss of heterozygosity using high resolution SNP microarray analysis in 117 patients referred for cytogenetic analysis and impact on clinical practise. *J Med Genet* 46(2):123-31.

Casper M, Petek E, Henn W, Niewald M, Schneider G, Zimmer V, et al (2014). Multidisciplinary treatment of desmoid tumours in Gardner's syndrome due to a large interstitial deletion of chromosome 5q. *QJM* 107(7):521-7.

Chaix MA, Andelfinger G, Khairy P (2016). Genetic testing in congenital heart disease: A clinical approach. *World Journal of Cardiology* 8(2):180-192.

Chakraborty D, Bernal AJ, Schoch, K, Howard TD, IP EH, Hooper SR, et al (2012). Dysregulation of DGCR6 and DGCR6L: psychopathological outcomes in chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Trans. Psychiatry* 2:e105.

Chen L, Fulcoli FG, Ferrentino R, Martucciello S, Illingworth, EA, Baldini A (2012). Transcriptional control in cardiac progenitors: Tbx1 interacts with the BAF chromatin remodeling complex and regulates Wnt5a. *PloS Genet* 8: e1002571.

Chen W, Zhang Y, Shen L, Zhu J, Cai K, Lu Z, et al (2022). Biallelic DNAH9 mutations are identified in Chinese patients with defective left-right patterning and cilia-related complex congenital heart disease. *Hum Genet*.

Cuoco C, Ronchetto P, Gimelli S, Béna F, Divizia MT, Lerone M, et al (2011). Microarray based analysis of an inherited terminal 3p26.3 deletion, containing only the CHL1 gene, from a normal father to his two affected children. *Orphanet J Rare Dis* 6:12.

- Cuturilo G, Drakulic D, Jovanovic I, Ilic S, Kalanj J, Vulicevic I, et al (2017). The Impact of 22q11.2 Microdeletion on Cardiac Surgery Postoperative Outcome. *Pediatr Cardiol* 38(8):1680-1685.
- De La Morena, MT, Eitson, JL, Dozmorov IM, Belkaya S, Hoover AR, Anguiano, E, et al (2013). Signature MicroRNA expression patterns identified in humans with 22q11.2 deletion/DiGeorge syndrome. *Clin. Immunol* 147: 11–22.
- Delea M, Espeche LD, Bruque CD, Bidondo MP, Massara LS, Oliveri J, et al (2018). Genetic Imbalances in Argentinean Patients with Congenital Conotruncal Heart Defects. *Genes (Basel)* 9(9):454.
- Dentici ML, Di Pede A, Lepri FR, Gnazzo M, Lombardi MH, Auriti C, et al (2015). Kabuki syndrome: clinical and molecular diagnosis in the first year of life. *Arch Dis Child* 100(2):158-164.
- Digilio MC, Bernardini L, Consoli F, Lepri FR, Giuffrida MG, Baban A, et al (2013). Congenital heart defects in recurrent reciprocal 1q21.1 deletion and duplication syndromes: rare association with pulmonary valve stenosis. *Eur J Med Genet* 56(3):144-9.
- Dougherty GW, Loges NT, Klinkenbusch JA, Olbrich H, Pennekamp P, Menchen T, et al (2016). DNAH11 Localization in the Proximal Region of Respiratory Cilia Defines Distinct Outer Dynein Arm Complexes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55(2):213-224.
- Du Q, de la Morena MT, van Oers NSC (2020). The Genetics and Epigenetics of 22q11.2 Deletion Syndrome. *Front Genet* 10:1365
- Dyer LA, Kirby ML (2009). Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev Biol* 330(2):305-317.
- Earls L, Bayazitov I, Fricke R, Berry R, Illingworth E, Mittleman G, et al. (2010). Dysregulation of presynaptic calcium and synaptic plasticity in a mouse model of 22q11 deletion syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30: 15843–15855.
- Earls LR, Fricke RG, Yu J, Berry RB, Baldwin LT, Zakharenko S (2012). Age-dependent MicroRNA control of synaptic plasticity in 22q11deletion syndrome and schizophrenia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci* 32: 14132–14144.
- Edelmann L, Hirschhorn K (2009). Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci* 1151:157-166.
- Edwards SK, Baron J, Moore CR, Liu Y, Perlman DH, Hart RP, et al (2014). Mutated in colorectal cancer (MCC) is a novel oncogene in B lymphocytes. *J Hematol Oncol* 7:56.

- Fagali C, Kok F, Nicola P, Kim C, Bertola D, Albano L, et al (2009). MLPA analysis in 30 Sotos syndrome patients revealed one total NSD1 deletion and two partial deletions not previously reported. *Eur J Med Genet* 52(5):333-336
- Fahed AC, Nemer, GM (2012). Genetic Causes of Syndromic and Non-Syndromic Congenital Heart Disease in Cooper DN Chen J, editors. *Mutations in Human Genetic Disease*, IntechOpen, London.
- Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE (2013). Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res* 112(4):707-720.
- Favier R, Akshoomoff N, Mattson S, Grossfeld P (2015). Jacobsen syndrome: Advances in our knowledge of phenotype and genotype. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 169(3):239-250.
- Fliegauf M, Olbrich H, Horvath J, Wildhaber JH, Zariwala MA, Kennedy M, et al (2005). Mislocalization of DNAH5 and DNAH9 in respiratory cells from patients with primary ciliary dyskinesia. *Am J Respir Crit Care Med* 171(12):1343-1349.
- Forsythe E, Beales PL (2013). Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 21(1):8-13.
- Fulcoli, F, Franzese M, Liu X, Zhang Z, Angelini C, Baldini, A (2016). Rebalancing gene haploinsufficiency in vivo by targeting chromatin. *Nat. Commun* 7:11688.
- Garcia-Padilla C, Aránega A, Franco D (2018). The role of long non-coding RNAs in cardiac development and disease. *AIMS Genet* 26;5(2):124-140.
- Garg V, Kathiriya IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al (2003). GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424(6947):443-447.
- Geddes GC, Earing MG (2018). Genetic evaluation of patients with congenital heart disease. *Curr Opin Pediatr* 30(6):707-713.
- Geng J, Picker J, Zheng Z, Zhang X, Wang J, Hisama J et al (2014). Chromosome microarray testing for patients with congenital heart defects reveals novel disease causing loci and high diagnostic yield. *BMC Genomics* 15(1):1127.
- Granados-Riveron JT, Ghosh TK, Pope M, Bu'Lock F, Thornborough C, Eason J, et al (2010). Alpha-cardiac myosin heavy chain (MYH6) mutations affecting myofibril formation are associated with congenital heart defects. *Hum Mol Genet* 19(20):4007-4016.
- Greenway SC, Pereira AC, Lin JC, DePalma SR, Israel SJ, Mesquita SM, et al (2009). De novo copy number variants identify new genes and loci in isolated sporadic tetralogy of Fallot. *Nat Genet* 41(8):931-935.

- Geva T, Martins JD, Wald RM (2014). Atrial septal defects. *Lancet* 383(9932):1921-32.
- Gilboa SM, Devine OJ, Kucik JE, Oster ME, Riehle-Colarusso T, Nembhard WN, et al (2016). Congenital heart defects in the United States: estimating the magnitude of the affected population in 2010. *Circulation* 134:101-109.
- Gill HK, Splitt M, Sharland GK, Simpson JM (2003). Patterns of recurrence of congenital heart disease: an analysis of 6,640 consecutive pregnancies evaluated by detailed fetal echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 42(5):923-929.
- Gordon, J, Patel S R, Mishina Y, Manley NR (2008). Evidence for an early role for BMP4 signaling in thymus and parathyroid morphogenesis. *Dev. Biol* 339: 141.
- Grossman TR, Gamliel A, Wessells RJ, Taghli-Lamalle O, Jepsen K, Ocorr K, et al (2011). Over-expression of DSCAM and COL6A2 cooperatively generates congenital heart defects. *PLoS* 7(11):e1002344.
- Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, et al (2011). Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 155A(7):1511-1516.
- Hasten E, McDonald-McGinn DM, Crowley TB, Zackai E, Emanuel BS, Morrow BE, et al (2018). Dysregulation of TBX1 dosage in the anterior heart field results in congenital heart disease resembling the 22q11.2 duplication syndrome. *Hum Mol Genet* 27(11):1847-1857.
- Heald B, Moran R, Milas M, Burke C, Eng C (2007). Familial adenomatous polyposis in a patient with unexplained mental retardation. *Nat Clin Pract Neurol* 3(12):694-700.
- Hinton RB (2008). The family history: reemergence of an established tool. *Crit Care Nurs Clin North Am* 20(2):149-158.
- Homsy J, Zaidi S, Shen Y, Ware JS, Samocha KE, Karczewski KJ, et al (2015). De novo mutations in congenital heart disease with neurodevelopmental and other congenital anomalies. *Science* 350(6265):1262-1266.
- Ikeda M, Williams N, Williams HJ, Smith R, Monks S, Owen MJ, et al (2010). Failure to confirm association between PIK4CA and psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010;153B(4), 980–982.
- Ito S, Chapman K, Kisling M, John A (2017). Appropriate use of genetic testing in congenital heart disease patients. *Current Cardiology Reports* 19(13)24.
- Jankowski S, Currie-Fraser E, Xu L, Coffa J (2008). Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis on capillary electrophoresis instruments for a rapid gene copy number study. *J Biomol Tech* 19(4):238-43.

Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, et al (2007). Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of pediatrics. *Circulation* 115: 2995-3014.

Jerves T, Beaton A, Kruszka P (2020). The genetic workup for structural congenital heart disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 184(1):178-186.

Jin SC, Homsy J, Zaidi S, Lu Q, Morton S, DePalma SR, et al (2017). Contribution of rare inherited and de novo variants in 2,871 congenital heart disease probands. *Nat Genet* 49(11):1593-1601.

Jones, KL, Smith DW (2006). *Smith's recognizable patterns of human malformation*. Philadelphia, Elsevier Saunders.

Jones SE, Joice P, Cochrane L, Thoresen I, Quyn A, Nähke I (2010). Is familial adenomatous polyposis associated with sensorineural hearing loss? *Int J Audiol* 49(10):762-764.

Kazlowski P, Jasiska AJ, Kwaitkowski DJ (2008). New application and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis* 29(23):4627-26.

Kearney MH, Thorland CE, Brown K, Quintero-Rivera F, South S on behalf of A working group of American College of Medical Genetics (ACMG) Laboratory Quality Assurance Committee (2011). American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med* 13:680–685.

Kennedy MP, Plant BJ (2014). Primary ciliary dyskinesia and the heart: cilia breaking symmetry. *Chest* 146(5):1136-1138.

Kim JO, Song DW, Kwon EJ, Hong SE, Song HK, Min CK, et al (2015). miR-185 plays an anti-hypertrophic role in the heart via multiple targets in the calcium-signaling pathways. *PLoS One* 10(3): e0122509.

Kliegman RM, Stanton BF, St.Geme JW, Schor NF, and Behrman RE, editor (2011). *Nelson Textbook of pediatrics* (19th edition). Philadelphia:Elsevier Saunders.

Kloesel B, DiNardo JA, Body SC (2016). *Cardiac Embryology and Molecular Mechanisms of Congenital Heart Disease: A Primer for Anesthesiologists*. *Anesth Analg* 123(3):551-569.

Kodo K, Yamagishi H (2011). A decade of advances in the molecular embryology and genetics underlying congenital heart defects. *Circ J* 75(10):2296-304.

Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, de Leeuw N, Knight SJ, Regan R, et al (2006). A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. *Nat Genet*. 2006 Sep;38(9):999-1001.



Kothari SS (2014). Non-cardiac issues in patients with heterotaxy syndrome. *Ann Pediatr Cardiol* 7(3):187-192.

Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL (2019). Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost* 45(7):661-673.

Leoz ML, Carballal S, Moreira L, Ocaña T, Balaguer F (2015). The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *Appl Clin Genet* 8:95-107.

Leventopoulos G, Kitsiou-Tzeli S, Kritikos K, Psoni S, Mavrou A, Kanavakis E, et al (2009). Clinical study of Sotos syndrome patients with review of the literature. *Pediatr Neurol* 40(5):357-64.

Levy B, Burnside RD (2019). Are all chromosome microarrays the same? What clinicians need to know. *Prenat Diagn* 39(3):157-164.

Li YJ, Yang YQ (2017). An update on the molecular diagnosis of congenital heart disease: focus on loss-of-function mutations. *Expert Rev Mol Diagn* 17(4):393-401.

Li Z, Huang J, Liang B, Zeng D, Luo S, Yan T, et al (2019). Copy number variations in the GATA4, NKX2-5, TBX5, BMP4 CRELD1, and 22q11.2 gene regions in Chinese children with sporadic congenital heart disease. *J Clin Lab Anal* 33(2):e22660.

Liehr T, Grehl H, Rautenstrauss B (1997). Molecular diagnosis of PMP22-associated neuropathies using fluorescence in situ hybridization (FISH) on archival peripheral nerve tissue preparations. *Acta Neuropathol* 94(3):266-71.

Lin AE, Alexander ME, Colan SD, Kerr B, Rauen KA, Noonan J, et al (2011). Clinical, pathological, and molecular analyses of cardiovascular abnormalities in Costello syndrome: a Ras/MAPK pathway syndrome. *Am J Med Genet A* 155A(3):486-507.

Lim TB, Foo SYR, Chen CK (2021). The Role of Epigenetics in Congenital Heart Disease. *Genes (Basel)* 12(3):390.

Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. (2018) Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med* 20(4):435-443.

Liu J, Cheng H, Xiang M, Zhou L, Wu B, Moskowitz IP, et al (2019). Gata4 regulates hedgehog signaling and Gata6 expression for outflow tract development. *PLoS Genet* 15(5):e1007711.

Liu W, Selever J, Wang, D, Lu, M.-F, Moses KA, Schwartz RJ, et al (2004). Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-archartery remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci*

101:4489–4494.

Loges NT, Antony D, Maver A, Deardorff MA, Güleç EY, Gezdirici A, et al (2018). Recessive DNAH9 Loss-of-Function Mutations Cause Laterality Defects and Subtle Respiratory Ciliary Beating Defects. *Am J Hum Genet* 103(6):995-1008.

Lu XY, Phung MT, Shaw CA, Pham K, Neil SE, Patel A et al (2008). Genomic imbalances in Neonates with birth defects: high detection rates by using chromosomal microarray analysis. *Pediatrics* 122(6):1310-1318.

Lucas JS, Burgess A, Mitchison HM, Moya E, Williamson M, Hogg C, et al (2014). Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Arch Dis Child*. 2014 99(9):850-856.

Maitra M, Koenig SN, Srivastava D, Garg V (2010). Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects. *Pediatr Res* 68(4):281-285F5.

Marín-García J (2009). Advances in molecular genetics of congenital heart disease. *Rev Esp Cardiol* 62(3):242-245.

Marion V, Stutzmann F, Gérard M, De Melo C, Schaefer E, Claussmann A, et al (2012). Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1 a BBSome and smoothed trafficking regulator, in a family with Bardet–Biedl syndrome with situs inversus an insertional polydactyly. *J Med Genet* 49(5):317-321.

Marković I, Bumbaširević V, Isaković A, Popadić D, Trajković V (2006). Osnove ćelijske biologije, laboratorijski praktikum. Beograd: Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu.

McDaniell R, Warthen DM, Sanchez-Lara PA, Pai A, Krantz ID, Piccoli DA, et al (2006). NOTCH2 mutations cause Alagille syndrome, a heterogeneous disorder of the notch signaling pathway. *Am J Hum Genet* 79(1):169-173.

McDermott DA, Bressan MC, He J, Lee JS, Aftimos S, Brueckner M, et al (2005). TBX5 genetic testing validates strict clinical criteria for Holt-Oram syndrome. *Pediatr Res* ;58(5):981-986.

McDonald-McGinn DM, Sullivan KE, Marino B, Philip N, Swillen A, Vorstman JA, Zackai EH, et al (2015). 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 1:15071.

McDonald-McGinn DM, Hain HS, Emanuel BS, Zackai E (2020). 22q11.2 Deletion Syndrome In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington.

McFadden DG, Olson EN (2002). Heart development: learning from mistakes. *Curr Opin Genet Dev* 12(3):328-335.

Mefford HC, Eichler EE (2009). Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease. *Curr Opin Genet Dev*. 19(3):196-204.

Miller DT, Lee K, Chung WK, Gordon AS, Herman GE, Klein TE, et al (2021). ACMG Secondary Findings Working Group. ACMG SF v3.0 list for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing: a policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 23(8):1381-1390.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.

Minette MS, Sahn DJ (2006). Ventricular septal defects. *Circulation* 114(20):2190-2197.

Miranovic V (2016). The incidence of congenital heart defects in the world regarding the severity of the defect. *Vojnosanit Pregl* 73(2):159-164

Mitchell ME, Sander TL, Klinkner DB, Tomita-Mitchell (2007). The molecular basis of congenital heart disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 19(3):228-237.

Mkrtchyan H, Gross M, Hinreiner S, Polytiko A, Manvelzan M, Mrasek K, et al (2010). Early embryonic chromosome instability results in stable mosaic pattern in human tissue. *Plos One* 5(3):e9591.

Molck MC, Simioni M, Paiva Vieira T, Sgardiolli IC, Paoli Monteiro F, et al (2017). Souza J, Fett-Conte AC, Félix TM, Lopes Monlléo I, Gil-da-Silva-Lopes VL. Genomic imbalances in syndromic congenital heart disease. *J Pediatr (Rio J)* 93(5):497-507.

Monteiro RAC, de Freitas ML, Vianna GS, de Oliveira VT, Pietra RX, Ferreira LCA, et al (2017). Major Contribution of Genomic Copy Number Variation in Syndromic Congenital Heart Disease: The Use of MLPA as the First Genetic Test. *Mol Syndromol* 8(5):227-235

Morrow BE, McDonald-McGinn DM, Emanuel BS, Vermeesch JR, Scambler PJ (2018). Molecular genetics of 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 176(10):2070-2081.

Morris CA (2010). Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C(2):203-208.

Mutlu ET, Aykan HH, Karagöz T (2018). Analysis of gene copy number variations in patients with congenital heart disease using multiplex ligation-dependent probe amplification. *Anatol J Cardiol* 20(1):9-15.

Nagy O, Baráth S, Ujfalusi A (2019). The role of microRNAs in congenital heart disease. *EJIFCC* 30(2):165-178.

Nagy O, Szakszon K, Orsolya Biro B, Mogyorosy G, Nagy D, Nagy B, et al (2109). Copy number variants detection by microarray and multiplex ligation dependent probe amplification in congenital heart disease. *J Biotech* 299:86-95.

- Natera-de Benito D, Sola A, Sousa PR, Boronat S, Expósito-Escudero J, Carrera-García L, et al (2021). Copper toxicity associated with an ATP7A-related complex phenotype. *Pediatr Neurol*. 119:40-44.
- Nees SN, Chung WK (2020). The genetics of isolated congenital heart disease. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 184(1):97-106.
- Nemer M (2008). Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovasc Pathol* 17(1):48-54.
- Niederlova V, Modrak M, Tsyklauri O, Huranova M, Stepanek O (2019). Meta-analysis of genotype-phenotype associations in Bardet-Biedl syndrome uncovers differences among causative genes. *Hum Mutat* 40(11):2068-2087.
- Olsen M, Fahy CJ, Costi DA, Kelly AJ, Burgoyne LL (2014). Anaesthesia-related haemodynamic complications in Williams syndrome patients: a review of one institution's experience. *Anaesth Intensive Care*. 2014 Sep;42(5):619-24.
- Øyen N, Poulsen G, Boyd HA, Wohlfahrt J, Jensen PK, Melbye M (2009). Recurrence of congenital heart defects in families. *Circulation* 120(4):295-301.
- Pajusalu S, Kahre T, Roomere H, Murumets Ü, Roht L, Simenson K, et al (2018). Large gene panel sequencing in clinical diagnostics -results from 501 consecutive cases. *Clin Genet* 93(1):78-83.
- Paladini D, Pistorio A, Wu LH, Meccariello G, Lei T, Tuo G, et al (2018). Prenatal diagnosis of total and partial anomalous pulmonary venous connection: multicenter cohort study and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 52(1):24-34.
- Pan Y, Geng R, Zhou N, Zheng GF, Zhao H, Wang J, et al (2015). TBX20 loss-of-function mutation contributes to double outlet right ventricle. *Int J Mol Med* 35(4):1058-66.
- Pavićević Savić D, Matić G (2011). *Molekularna biologija 1*. Beograd: NNK Internacional.
- Pengelly RJ, Ward D, Hunt D, Mattocks C, Ennis S (2018). Comparison of Mendeliome exome capture kits for use in clinical diagnostics. *Sci Rep* 10(1):3235.
- Philip N, Bassett A (2011). Cognitive, behavioural and psychiatric phenotype in 22q11.2 deletion syndrome. *Behav Genet* 41(3):403-412.
- Pierpont ME, Magoulas PL, Adi S, Kavamura MI, Neri G, Noonan J, et al (2014). Cardio-facio-cutaneous syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* 134(4):e1149-62.
- Pierpont ME, Brueckner M, Chung WK, Garg V, Lacro RV, McGuire AL, et al (2018). Genetic basis for congenital heart disease: revised. *Circulation* 138:e653-e711.

Pinchevsky E, Laneuville L, Srour M (2017). Distal 22q11.2 Microduplication: Case Report and Review of the Literature. *Child Neurol Open* 4:2329048X17737651.

Posch MG, Gramlich M, Sunde M, Schmitt KR, Lee SH, Richter S, et al (2010). A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects. *J Med Genet* 47(4):230-235.

Porter ME, Sale WS (2000). The 9 + 2 axoneme anchors multiple inner arm dyneins and a network of kinases and phosphatases that control motility. *J Cell Biol* 151(5):F37-42.

Postma AV, van Engelen K, van de Meerakker J, Rahman T, Probst S, Baars MJ, Bauer U, et al (2011). Mutations in the sarcomere gene MYH7 in Ebstein anomaly. *Circ Cardiovasc Genet* 4(1):43-50.

Preuss C, Capredon M, Wünnemann F, Chetaille P, Prince A, Godard B, et al (2016). Family Based Whole Exome Sequencing Reveals the Multifaceted Role of Notch Signaling in Congenital Heart Disease. *PLoS Genet* 12(10):e1006335.

Priya S, Nampoothiri S, Sen P, Sripriya S (2016). Bardet-Biedl syndrome: Genetics, molecular pathophysiology, and disease management. *Indian J Ophthalmol* 64(9):620

Pu WT, Ishiwata T, Juraszek AL, Ma Q, Izumo S (2004). GATA4 is a dosage-sensitive regulator of cardiac morphogenesis. *Dev Biol* 275(1):235-244.

Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, Haidere MF, Runa NJ, Akter N (2017). Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science. *Cureus* 9(6):e1325.

Rauch A, Beese M, Mayatepek E, Dörr HG, Wenzel D, Reis A, et al (2003). A novel 5q35.3 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet A* 121A(1):1-8.

Rauch A, Dörr HG (2007). Chromosome 5q subtelomeric deletion syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 145C(4):372-376.

Resa R, Biesecker BB, Benneti RL, Blum S, Hahn SE, Strecker MN, et al (2006). A new definition of Genetic Counseling: National Society of Genetic Counseling:National Society of Genetic Counselors' Task Force report. *J National Society of Genetic Couns* 15:77-83.

Richards AA, Garg V (2010). Genetics of congenital herat disease. *Curr Card Rev* 6(2):91-97.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al (2015). 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* 17(5):405.

Rizzo JM, Buck MJ (2012). Key principles and clinical application of next generation DNA sequencing. *Cancer Prevention Research* 5(7): 887-900.

Robinson PN, Mundlos S (2010). The human phenotype ontology. *Clin Genet* 77(6):525-534.

Rochais F, Mesbah K, Kelly RG (2009). Signaling pathways controlling second heart field development. *Circ Res* 104(8):933-942.

Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al (2010). Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics* 126(4):746-59.

Rosenfeld J, Patel A (2016). Chromosomal Microarrays: Understanding Genetics of Neurodevelopmental Disorders and Congenital Anomalies. *J Pediatr Genet* 6(1):42-50.

Rozas MF, Benavides F, León L, Repetto GM (2019). Association between phenotype and deletion size in 22q11.2 microdeletion syndrome: systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis* 14(1):195.

Saliba A, Figueiredo ACV, Baroneza JE, Afiune JY, Pic-Taylor A, Oliveira SF, et al (2020). Genetic and genomics in congenital heart disease: a clinical review. *J Pediatr (Rio J)* 96(3):279-288.

Satoda M, Zhao F, Diaz GA, Burn J, Goodship J, Davidson HR, et al (2000). Mutations in TFAP2B cause Char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nat Genet* 25(1):42-46.

Schaaf CP, Wiszniewska J, Beaudet AL. Copy number and SNP arrays in clinical diagnostics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2011;12:25-51.

Sellier C, Hwang VJ, Dandekar R., Durbin-Johnson B, Charlet-Berguerand, N, Ander BP, et al (2014). Decreased DGCR8 expression and miRNA dysregulation in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *PloS One* 9(8): e103884.

Setty SP, Shen I (2006). Atrioventricular septal defects. In: Nichols DG, Ungerleider RM, Spevak PJ, Greeley WJ, Cameron DE, Lappe DG, Wetzell RC, editors. *Critical heart disease in infants and children (Second Edition)*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 593-608.

Shanshen E, Rosenberg J, Van Bergen AH (2018). Identification of Novel Congenital Heart Disease Candidate Genes Using Chromosome Microarray. *Pediatr Cardiol* 39(1):148-159.

Shiraishi I, Ichikawa H (2012). Human heterotaxy syndrome—from molecular genetics to clinical features, management, and prognosis. *Circ J* 76(9):2066-2075.

Shuib S, McMullan D, Rattenberry E, Barber RM, Rahman F, Zatyka M, et al (2009). Microarray based analysis of 3p25-p26 deletions (3p- syndrome). *Am J Med Genet A* 149A(10):2099-105.

Simmons MA, Brueckner M (2017). The genetics of congenital heart disease...Understanding and improving long term outcomes in congenital heart disease: A review for the general cardiologist and primary care physician. *Curr Opin. Pediatr* 29(5):520-528.

Sommer RJ, Hijazi ZM, Rhodes JF (2008). Pathophysiology of congenital heart disease in the adult: part III: Complex congenital heart disease. *Circulation* 117(10):1340-1350.

Sorensen KM, El-Segaier M, Fernlund E, Errami A, Bouvagnet P, Nehme N, et al (2012). Screening of congenital heart disease patients using multiplex ligation-dependent probe amplification: early diagnosis of syndromic patients. *Am J Med Genet A* 158A(4):720-725.

South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM (2013). ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision. *Genet Med* 15(11):90.

Stallmeyer B, Fenge H, Nowak-Göttl U, Schulze-Bahr E (2010). Mutational spectrum in the cardiac transcription factor gene NKX2.5 (CSX) associated with congenital heart disease. *Clin Genet* 78(6):533-540.

Stankiewicz P, Lupski JR (2002). Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends Genet* 18(2):74-82.

Steurer MA, Baer RJ, Burke E, Peyvandi S, Oltman S, Chamberc CD, et al (2108). Effect of fetal growth on 1-year mortality in neonates with critical heart disease. *J Am Heart Assoc* 7:e009693.

Stupia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V (2012). Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic disease. *Int J Mol Sci* 13(3):3245–3276.

Sun Y, Ruivenkamp CA, Hoffer MJ, Vrijenhoek T, Kriek M, van Asperen CJ, et al (2015). Next-generation diagnostics: gene panel, exome, or whole genome? *Hum Mutat* 36(6):648-655

Syrmou A, Tzetis M, Fryssira H, Kosma K, Olkonmakis V, Glannikou K et al (2013). Array comparative genomic hybridization as a clinical diagnostic tool in syndromic and nonsyndromic congenital heart disease. *Pediatr Reserach* 75(6): 7772- 7776.

Sweeney E, Fryer A, Walters M (2000). Char syndrome: a new family and review of the literature emphasising the presence of symphalangism and the variable phenotype. *Clin Dysmorphol* 9(3):177-182.

Tang Y, Poustovoitov MV, Zhao K, Garfinkel M, Canutescu A, Dunbrack R, et al (2006). Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol* 13(10):921-929.

- Ta-Shma A, El-lahham N, Edvardson S, Stepensky P, Nir A, Perles Z, et al (2014). Conotruncal malformations and absent thymus due to a deleterious NKX2-6 mutation. *J Med Genet* 51(4):268-270.
- Taylor TH, Gitlin SA, Patrick JL, Crain JL, Wilson JM, Griffin DK (2014). The origin, mechanisms, incidence and clinical consequences of chromosomal mosaicism in humans. *Hum Reprod Update* 20(4):571-581.
- Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al (2007). Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J* 28(22):2778-2784.
- Thienpont B, Zhang L, Postma AV, Breckpot J, Tranchevent LC, Van Loo P, et al (2010). Haploinsufficiency of TAB2 causes congenital heart defects in humans. *Am J Hum Genet*. 2010 Jun 11;86(6):839-849.
- Trider CL, Arra-Robar A, van Ravenswaaij-Arts C, Blake K (2017). Developing a CHARGE syndrome checklist: Health supervision across the lifespan (from head to toe). *Am J Med Genet A* 173(3):684-691.
- Turnpenny PD, Ellard S (2012). Alagille syndrome: pathogenesis, diagnosis and management. *Eur J Hum Genet* 20(3):251-257.
- Vorstman JA, Chow EW, Ophoff RA, van Engeland H, Beemer FA, Kahn RS, et al (2009). Association of the PIK4CA schizophrenia-susceptibility gene in adults with the 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B(3):430-433.
- Wat MJ, Shchelochkov OA, Holder AM, Breman AM, Dagli A, Bacino C, et al (2009). Chromosome 8p23.1 deletions as a cause of complex congenital heart defects and diaphragmatic hernia. *Am J Med Genet A* 149A(8):1661-1677.
- Weise A, Gross M, Mrasek K, Mkrtychyan H, Horsthemke B, Jonsrud C, et al (2008). Parental-origin-determination fluorescence in situ hybridization distinguishes homologous human chromosomes on a single-cell level. *Int J Mol Med* 21(2):189-200.
- Weise A, Mrasek K, Klein E, Mulatinho M, Llerena JC Jr, Hardekopf D, et al (2012). Microdeletion and microduplication syndromes. *J Histochem Cytochem* 60(5):346-358.
- Wessel A, Gravenhorst V, Buchhorn R, Gosch A, Partsch CJ, Pankau R (2004). Risk of sudden death in the Williams-Beuren syndrome. *Am J Med Genet A*. 2004 Jun 15;127A(3):234-237.
- Wessels MW, Brooks AS, Hoogeboom J, Niermeijer MF, Willems PJ (2002). Kabuki syndrome: a review study of three hundred patients. *Clin Dysmorphol* 11(2):95-102.
- Williams K, Carson J, Lo C (2019). Genetics of Congenital Heart Disease. *Biomolecules* 9(12):879.



- Wu XL, Li R, Fu F, Pan M, Han J, Yang X, et al (2017). Chromosome microarray analysis in the investigation of children with congenital heart disease. *BMC Pediatr* 17(1):117.
- Xu B, Hsu PK, Stark K, Karayiorgou M, Gogos, J (2013). Derepression of a neuronal inhibitor due to miRNA dysregulation in a schizophrenia-related microdeletion. *Cel* 152(1-2):262-751.
- Yang, L, Du X, Liu L, Cao Q, Pan Z, Li, Q (2016). miR-1306 mediates the feedback regulation of the TGF- $\beta$ /SMAD signaling pathway in Granulosa cells. *Cells* 8(4):298.
- Yokoyama E, Del Castillo V, Sanchez S, Ramos S, Molina B, Torres L, et al (2018). Derivate chromosomes involving 5p large rearranged segments went unnoticed with use of conventional cytogenetics. *Mol Cytogenet* 11(1)30.
- Zaidi S, Brueckner M (2017). Genetics and genomics of congenital heart disease. *Circ Res* 120:923-940.
- Zanardo EA, Dutra RL, Piazzon FB, Torchio Diaz A, Monteiro Novo-Filho G, Nascimento AM, et al (2017). Cytogenomic assesment of the diagnosis of 93 patient with developmental delay and multiple congenital abnormalities: The Brazilian expirience. *Clinics* 72(9):526-37.
- Zatyka M, Priestley M, Ladusans EJ, Fryer AE, Mason J, Latif F, et al (2005). Analysis of CRELD1 as a candidate 3p25 atrioventricular septal defect locus (AVSD2). *Clin Genet* 67(6):526-8.
- Zhang Q, Seo S, Bugge K, Stone EM, Sheffield VC (2012). BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes. *Hum Mol Genet* 21(9):1945-1953.
- Zhang Y, Dai J, Tang J, Zhou L, Zhou M (2017). MicroRNA-649 promotes HSV-1 replication by directly targeting MALT1. *J Med Virol* 89(6):1069-1079.
- Zhou XL, Giacobini M, Anderlid BM, Anckarsäter H, Omrani D, Gillberg C, et al (2007). Association of adenomatous polyposis coli (APC) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B(3):351-4.
- Zhu H (2016). Forkehead box transcription factors in embryonic heart development and congenital heart disease. *Life Sci* 144:194-201.

## BIOGRAFIJA AUTORA

Aleksandra Miletić je rođena 06.07.1987. godine u Kraljevu. Nakon završene gimnazije „Vuk Karadžić” u Trstenku, 2006. godine je upisala Biološki fakultet u Beogradu, smer Molekularna biologija i fiziologija, usmerenje Eksperimentalna biomedicina. Odbranom Diplomskog rada 2012. godine je diplomirala sa prosečnom ocenom 9,06 i stekla akademsko zvanje Diplomirani molekularni biolog i fiziolog. Od 2013. godine zaposlena je u Laboratoriji za genetičku i molekularnu dijagnostiku Univerzitetske dečje klinike u Beogradu, gde se bavi dijagnostikom abnormalnosti genetičkog materijala koje uzrokuju različite bolesti kod dece. Svoje obrazovanje proširila je i Specijalističkim akademskim studijama iz oblasti Genetike koje je 2018. godine upisala na Biološkom fakultetu u Beogradu. Odbranom Specijalističkog rada 2020. godine je stekla akademsko zvanje Specijalista biolog. Doktorske studije iz oblasti Molekularne medicine na Medicinskom fakultetu u Beogradu je upisala 2013. godine. Autor i koautor je četiri naučna rada objavljena u međunarodnim časopisima, kao i 15 saopštenja koji su prezentovana na konferencijama u zemlji i inostranstvu.

# Izjava o autorstvu

Potpisana: Aleksandra Miletić

Broj upisa: MM-16/13

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Detekcija i karakterizacija genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritično teškim urođenim srčanim manama

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 01.04.2022.

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Aleksandra Miletić

Broj upisa: MM-16/13

Studijski program: Molekularna medicina

Naslov rada: Detekcija i karakterizacija genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritično teškim urođenim srčanim manama

Mentor: Prof. dr Goran Čuturilo

Komentor: Prof. dr Vojislav Parezanović

Potpisana: Aleksandra Miletić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime, prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 01.04.2022.

# Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Detekcija i karakterizacija genomskih abnormalnosti kod novorođenčadi sa kritično teškim urođenim srčanim manama

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo-nekomercijalno
- 3. Autorstvo-nekomercijalno-bez prerade**
4. Autorstvo-nekomercijalno-deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo-bez prerade
6. Autorstvo-deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda



U Beogradu, 01.04.2022.