

# Rezultati kliničkog genetičkog testiranja u djece s neurorazvojnim odstupanjima u KBC-u Split u razdoblju od 2016. do 2019. godine

---

**Pupić-Vurilj, Veronika**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:557727>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Veronika Pupić-Vurilj**

**REZULTATI KLINIČKOG GENETIČKOG TESTIRANJA U DJECE S  
NEURORAZVOJNIM ODSUPANJIMA U KBC-U SPLIT U RAZDOBLJU OD 2016.  
DO 2019. GODINE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2021./2022.**

**Mentor:  
Izv. prof. dr. sc. Bernarda Lozić, prim. dr. med.**

**Split, rujan 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Veronika Pupić-Vurilj**

**REZULTATI KLINIČKOG GENETIČKOG TESTIRANJA U DJECE S  
NEURORAZVOJNIM ODSUPANJIMA U KBC-U SPLIT U RAZDOBLJU OD 2016.  
DO 2019. GODINE**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:  
2021./2022.**

**Mentor:  
Izv. prof. dr. sc. Bernarda Lozić, prim. dr. med.**

**Split, rujan 2022.**

## SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
1.1.	Neurorazvojni poremećaji .....	2
1.1.1.	Intelektualno zaostajanje .....	2
1.1.2.	Globalno razvojno zaostajanje .....	3
1.1.3.	Pervazivni razvojni poremećaji .....	4
1.1.4.	Nedostatak pažnje i aktivnosti .....	5
1.1.5.	Cerebralna paraliza .....	5
1.1.6.	Epilepsije i epileptički sindromi .....	6
1.2.	DNK i kromosomi .....	8
1.2.1.	Ljudski genom .....	8
1.3.	Klasifikacija nasljednih bolesti .....	9
1.3.1.	Kromosomske anomalije .....	9
1.3.2.	Mendelski nasljedne bolesti .....	11
1.3.3.	Monogenski nasljedne bolesti koje ne prate Mendelove zakone .....	13
1.3.4.	Multifaktorske nasljedne bolesti .....	15
1.4.	Klasična i molekularna citogenetika .....	16
1.4.1.	Klasična kariotipizacija .....	16
1.4.2.	Fluorescentna in situ hibridizacija .....	17
1.4.3.	Kromosomski microarray .....	17
1.4.4.	Sekvenciranje sljedeće generacije .....	19
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	22
2.1.	Ciljevi istraživanja .....	23
2.2.	Hipoteza .....	23
3.	MATERIJALI I METODE .....	24
3.1.	Ispitanici .....	25
3.2.	Ustroj istraživanja .....	25
3.3.	Etička načela .....	25
3.4.	Opis istraživanja .....	25
3.5.	Statistička analiza podataka .....	26

4.	REZULTATI.....	27
5.	RASPRAVA.....	39
6.	ZAKLJUČCI.....	44
7.	LITERATURA.....	46
8.	SAŽETAK.....	51
9.	SUMMARY .....	53
10.	ŽIVOTOPIS .....	55

*Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Bernardi Lozić na beskrajnom strpljenju, te pruženom vremenu i podršci prilikom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Hvala i mom suprugu Petru i obitelji bez kojih ne bih mogla završiti ovo poglavlje života.*

*Mom Viktoru, koji je svom ovom trudu dao novi smisao.*

**POPIS OZNAKA I KRATICA:**

ADHD – nedostatak pažnje i koncentracije (engl. *attention deficit and hyperactivity disorder*)

CMA – kromosomski microarray (engl. *chromosomal microarray*)

CNV – varijanta broja kopija (engl. *copy number variant*)

DSM-5 – Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, 5. izdanje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition*)

FISH – fluorescentna in situ hibridizacija (engl. *fluorescent in situ hybridisation*)

GDD – globalno razvojno zaostajanje (engl. *global developmental delay*)

ID – intelektualno zaostajanje (engl. *intellectual disability*)

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*)

PDD – pervazivni razvojni poremećaji (engl. *pervasive developmental disorders*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

VUS – varijanta nejasnoga značenja (engl. *variant of uncertain significance*)

WES – sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing*)

WGS – sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*)

## **1. UVOD**



## **1.1. Neurorazvojni poremećaji**

Neurorazvojni poremećaji su heterogena skupina neprogresivnih, nezaraznih stanja koja uzrokuju odstupanja u razvoju različite težine. Neurorazvojni poremećaji karakterizirani su deficitima u kogniciji, komunikaciji, ponašanju i motoričkim vještinama koji utječu na osobne, socijalne, obrazovne te radne sposobnosti (1).

Prema Dijagnostičkom i statističkom priručniku za mentalne poremećaje, 5. izdanje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition, DSM-5*), neurorazvojni poremećaji obuhvaćaju intelektualno zaostajanje (engl. *intellectual disability, ID*), globalno razvojno zaostajanje (engl. *global developmental delay, GDD*), poremećaje komunikacije i govora, pervazivne razvojne poremećaje (engl. *pervasive developmental disorders, PDD*), nedostatak pažnje i koncentracije (engl. *attention deficit and hyperactivity disorder, ADHD*), poremećaje učenja te motorne poremećaje (2). Izvan klasifikacije DSM-5, u neurorazvojne poremećaje ubrajamo poremećaje vida i sluha, cerebralnu paralizu i epilepsiju (3).

Iako su neurorazvojni poremećaji neprogresivni, deficiti se mogu kompenzirati neurobiološkim procesima plastičnosti i maturacije mozga u perinatalnoj i ranoj dječjoj dobi. Upravo zbog procesa neuroplastičnosti, kliničke slike neurorazvojnih poremećaja vrlo su različite i dobnouvjetovane (4-7).

### **1.1.1. Intelektualno zaostajanje**

Intelektualno zaostajanje, prethodno zvano mentalna retardacija, definira značajno ispodprosječno intelektualno funkcioniranje uz nedostatak adaptivnog ponašanja koje se javlja prije osamnaeste godine života (8). Prema DSM-5, za dijagnozu intelektualnog zaostajanja potrebno je zadovoljiti tri kriterija: deficit u intelektualnom funkcioniranju potvrđen kliničkom evaluacijom i testiranjem kvocijenta inteligencije, deficit osobnog i socijalnog adaptivnog funkcioniranja te očitovanje deficita tijekom djetinjstva.

Rezultati testova kvocijenta inteligencije standardizirani su tako da 100 bodova označava prosječnu vrijednost, a 15 bodova standardnu devijaciju. Osobe s intelektualnim zaostajanjem postižu rezultat od dvije standardne devijacije ispod prosječne vrijednosti. Osobe s intelektualnim zaostajanjem čine 2,5% opće populacije (8).

Intelektualno zaostajanje može biti uzrokovano nasljednim i okolišnim čimbenicima. Najčešći okolišni predispozicijski čimbenici su pušenje, konzumacija alkohola i infekcije majke tijekom trudnoće, hipoksično-ishemijska encefalopatija, intrakranijalna krvarenja te nedonošenost. Intelektualno zaostajanje javlja se i u kromosomopatijama, poput Downovog, triplo X i Klinefelterovog sindroma, te mikrodelecijskim sindromima, primjerice Prader-Willijev, Williamsov i Smith-Magenisov sindrom. Najčešći je uzrok intelektualnog zaostajanja kod dječaka sindrom fragilnog X-kromosoma, te Rettov sindrom kod djevojčica. Intelektualno zaostajanje također se javljaju u nasljednim metaboličkim bolestima (9).

Klasifikacija i obilježja intelektualnog zaostajanja navedene su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Klasifikacija intelektualnog zaostajanja

<b>Kategorija</b>	<b>Udio slučajeva</b>	<b>Kvocijent inteligencije</b>	<b>Osobno i socijalno funkcioniranje</b>
Blago	85%	50-70	Moguća samostalnost uz povremenu pomoć
Umjereno	10%	35-50	Moguća samostalnost u specijalnim ustanovama
Teško	3,5%	20-35	Potreban nadzor i asistencija u svakodnevnim aktivnostima
Duboko	1,5%	<20	Potrebna potpuna briga tijekom cijelog života

### 1.1.2. Globalno razvojno zaostajanje

Globalno razvojno zaostajanje (engl. *global developmental delay*, GDD) značajno je odstupanje koje nastupa prije pete godine života, a zahvaća najmanje dvije domene neurorazvoja (10). Odstupanja mogu biti u domenama motoričkog, jezičnog, kognitivnog i socijalnog razvoja (11).

Etiologiju globalnog razvojnog zaostajanja moguće je utvrditi kod 40-80% bolesnika, od čega su najčešće genetske bolesti te perinatalna asfiksija (11). Tablica 2. prikazuje etiologiju i doba nastanka globalnog razvojnog zaostajanja.

**Tablica 2.** Etiologija globalnog razvojnog zaostajanja

Kategorija uzroka	Mogući uzroci
Prenatalno	Genetski
	Metabolički
	Teratogeni/toksini
	Infekcije
Perinatalno	Asfiksija
	Nedonešenost
Postnatalno	Zanemarivanje (nepovoljno psihosocijalno okruženje)
	Infekcije
	Trauma
	Toksini

### 1.1.3. Pervazivni razvojni poremećaji

Pervazivni razvojni poremećaji skupina su neuropsihijatrijskih razvojnih poremećaja karakterizirana specifičnim zaostajanjem u socijalnom, komunikativnom i kognitivnom razvoju, s početkom prije treće godine života. Javljaju se kod jednog na 90-150 djece s omjerom 1:3-4 u korist dječaka (12).

Prema DSM-5, pervazivni razvojni poremećaji klasificiraju se kao poremećaji autističnog spektra, Rettov sindrom te dezintegracijski poremećaj dječje dobi. Poremećaji autističnog spektra uključuju autizam, Aspergerov sindrom te pervazivni razvojni poremećaj koji nije svrstan drugamo (engl. *pervasive developmental disorder not otherwise specified*, PDD-NOS) (13).

Glavna obilježja pervazivnih razvojnih poremećaja jesu poteškoće u socijalnoj verbalnoj i neverbalnoj komunikaciji te stereotipni, repetitivni obrasci ponašanja. Dijagnoza se najčešće postavlja oko treće godine života, iako se simptomi poremećaja mogu uočiti već u prvim mjesecima života. Diferencijalno dijagnostički potrebno je u obzir uzeti poremećaje sluha i vida, specifične poremećaje govora i komunikacije, intelektualno zaostajanje te poremećaje privrženosti (12, 13).

Monozigotni blizanci pokazuju povećanu konkordanciju što upućuje na genetsku podlogu bolesti. Studije su pokazale povezanost s genskim lokusima na 1p, 2q, 3q, 7q, 11, 15q, 16p i 17q. Pervazivni razvojni poremećaji pojavljuju se kod djece s tuberoznom sklerozom, sindromom fragilnog X-kromosoma, Williams-Beurenovim i Prades-Willijevim sindromom, te sindromom Cornelia De Lange (13, 14).

#### **1.1.4. Nedostatak pažnje i aktivnosti**

Nedostatak pažnje i aktivnosti (engl. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD) neurorazvojno je odstupanje karakteriziran izrazitim poremećajem pažnje i koncentracije, pretjeranom aktivnosti i impulzivnim ponašanjem koji uzrokuju poteškoće u osobnom i socijalnom funkcioniranju. Prevalencija ADHD-a iznosi 5,3%, a češći je kod dječaka u omjeru 3-5:1 (12).

Prvi simptomi se pojavljuju prije 12. godine života. Klinička slika može se prezentirati predominantno poremećajem koncentracije, predominantno hiperaktivnošću te kombinacijom poremećaja koncentracije i aktivnosti (15).

ADHD multifaktorski je poremećaj. Prenatalni čimbenici koji utječu na razvoj mozga, poput pušenja, konzumacije alkohola i droga majke, nedonošenost, infekcije te prenatalna i perinatalna oštećenja mozga, povećavaju rizik od razvoja ADHD-a. Bitan čimbenik rizika također je i teška socijalna deprivacija u ranom djetinjstvu. Cijelogenomske su studije identificirale 12 genskih lokusa koji su povezani s oko 22% slučajeva (15).

#### **1.1.5. Cerebralna paraliza**

Cerebralna paraliza je neprogresivni neurorazvojni poremećaj kretanja, položaja i tonusa. Nastaje zbog oštećenja neuronskih kortikalnih i subkortikalnih puteva u prenatalnom, perinatalnom i ranom postnatalnom razdoblju. Cerebralna je paraliza često udružena s intelektualnim poteškoćama, epilepsijom, oštećenjima vida i sluha te poremećajima komunikacije i ponašanja. Učestalost cerebralne paralize iznosi 1-2/1000 živorođene djece (16).

Oštećenja središnjeg živčanog sustava najčešće nastaju prenatalno, a uzrokovana su hipoksijom i ishemijom, intrakranijalnim krvarenjima, intrauterinim infekcijama te razvojnim anomalijama mozga. Klinička slika uvelike ovisi o lokalizaciji i proširenosti oštećenja te gestacijskoj dobi. Bijela tvar, posebice oligodendroglija, izrazito je osjetljiva između 24. i 34. tjedna gestacije, dok je siva tvar, subkortikalne strukture i bazalni gangliji osjetljiviji kod donesenog novorođenčeta. Taj fenomen nazivamo selektivna vulnerabilnost (16).

Prema programu platforme SCPE-a (engl. *surveillance of cerebral palsy in Europe*), cerebralnu paralizu dijelimo na spastični, diskintezni i ataksički oblik, od čega je spastični oblik najčešći (85% slučajeva), a ataksički najrjeđi. Prema tradicionalnoj, topografskoj podjeli cerebralna paraliza može se očitovati kao parapareza, hemipareza, dipareza, tetrapareza te monopareza. Cerebralnu se paralizu još može klasificirati po težini bolesti po procjeni grube motoričke funkcije (engl. *gross motor function classification system*, GMFCS) u pet stupnjeva (16).

#### **1.1.6. Epilepsije i epileptički sindromi**

Epileptički napadaj posljedica je naglog nekontroliranog hipersinkronog izbijanja kortikalnih ili subkortikalnih neurona. Prema izvoru izbijanja i širenja, epileptički se napadaji dijele na žarišne (parcijalne) i generalizirane. Žarišni napadaji potječu iz ograničenog dijela jedne hemisfere mozga, a svijest je potpuno ili djelomično očuvana. Prezentacija napadaja može biti motorna, senzorna, autonomna, a ovisi o točnoj lokalizaciji izbijanja bioelektričnih impulsa. Generalizirani napadaj definira istodobno izbijanje bioelektričnih impulsa iz obje hemisfere uz gubitak svijesti. Generalizirani napadaji mogu biti konvulzivni ili nekonvulzivni (17).

Procjenjuje se da 1-1,5% svjetske populacije boluje od epilepsije, što ju svrstava među najčešće neurološke bolesti. Epilepsiju definira pojava dvaju ili više neprovociranih epileptičkih napadaja u razmaku većem od 24 sata (18). Epileptički sindromi skup su simptoma i znakova koji čine prepoznatljivi poremećaj.

Epilepsije i epileptičke sindrome možemo klasificirati prema etiologiji, dobi života kada se pojavljuju, te lokalizaciji ishodišta napadaja. Etiološki ih klasificiramo kao idiopatske (predominantno monogenske ili poligeneske), simptomatske (povezane s drugim razvojnim i prirođenim poremećajima), provocirane i kriptogene (19).

Pretpostavlja se da je 70-80% epilepsija uzrokovano genetskim, dok je ostatak uzrokovan stečenim promjenama. Wang i sur. podijeli su 977 gena povezanih s epilepsijama u kategorije: 84 gena kojima je epilepsija primarni fenotip, 73 gena povezana s teškim anomalijama mozga i epilepsijama, 536 gena koji uzrokuju druge neurološke poremećaje uz epilepsije te 284 gena koji su potencijalni uzročnici epilepsija (20). U Tablici 3. su navedeni primjeri epilepsija i epileptičkih sindroma te pojedini geni koji ih mogu uzrokovati (21).

**Tablica 3.** Epilepsije/epileptički sindromi i geni odgovorni za nastanak bolesti

<b>Epilepsija/epileptički sindrom</b>	<b>Geni</b>
Benigne familijarne neonatalne konvulzije	<i>KCNQ2, KCNQ3</i>
Benigne familijarne infantilne konvulzije	<i>PRRT2, SCN2A</i>
X-vezani infantilni spazmi	<i>CDKL5, ARX</i>
Dravetin sindrom	<i>SCN1A, SCN2A, GABRG2, GABRA1, PCDH19, STXBP1, HCN1</i>
Generalizirana epilepsija s febrilnim konvulzijama (GEFS)	<i>SCN1A, SCN2A, SCN1B, GABA-A, GABRD, GABRG2</i>
Progresivna mioklona epilepsija	<i>EMP2A/laforin, EMP2B/malin, Cystatin B</i>
Fokalne epilepsije	<i>CHRNA2, CHRNA4, CHRNB2</i>
Westov sindrom	<i>TSC1, CDKL5, ARX, STXBP1</i>
Lennox-Gastaut sindrom	<i>CHD2</i>

## 1.2. DNK i kromosomi

Deoksiribonukleinska kiselina (DNK) je osnovni predložak koji omogućuje prijenos genetičkih informacija s jedne generacije na drugu. DNK je tijekom procesa stanične diobe gusto kondenzirana u strukture koje nazivamo kromosomima. Somatske stanice ljudi sadržavaju 46 kromosoma, od čega 22 para autosomnih i jedan par spolnih kromosoma. Svaki se kromosom sastoji od dvaju istovjetnih lanaca, sestrinskih kromatida. Kromatide se međusobno povezane strukturom nazvanom centromera. Centromere su odgovorne za pomicanje kromosoma u staničnoj diobi te dijele kromosome na dva kraka: dugi q (franc. *grand*) i kratki p (franc. *petite*) krak (22).

Na kraju svakog kromosoma nalaze se telomere čije je glavna funkcija očuvanje strukture kromosoma. Telomere u ljudskim stanicama sastavljene su od ponavljajućih TTAGGG sljedova za čije je očuvanje odgovoran enzim telomeraza. Naime, postupno skraćivanje telomera je normalan proces staničnog starenja kojeg kontroliraju telomeraze, stoga većina stanica koje se dijele ne mogu proći više od 50-60 staničnih dioba (22).

S obzirom na položaj centromere kromosome dijelimo na metacentrične, submetacentrične i akrocentrične kromosome. Metacentričnim kromosomima centromera se nalazi na sredini kromosoma, dok se submetacentričnim kromosomima nalazi između sredine i kraja kromosoma. Akrocentričnim kromosomima centromera se nalazi na kraju kromosoma. Oni mogu ponekad imati kratke nastavke, satelite, koji sadrže višestruke kopije gena koji kodiraju ribosomsku RNK (22).

### 1.2.1. Ljudski genom

Procjenjuje se da ljudski genom sadržava 25 do 30 tisuća gena, što čini manje od 2% ukupne DNK. Ostatak DNK čini takozvana ne-kodirajuća DNK, često nazivana i DNK-smeće (engl. *junk DNA*). Ne-kodirajuća DNK sadržava intergensku DNK, koja čini oko 75% genoma, te introne, koji čine oko 24% ukupnog genoma. Geni nisu jednoliki raspoređeni po kromosomskim regijama. Najgušće ih nalazimo u subtelomeričkim regijama, dok su centromeričke i heterokromatinske regije uglavnom ne-kodirajuće. Distribucija gena varira i među kromosomima, pa su tako 19. i 22. kromosom bogati genima, a 4. i 18. kromosom sadržavaju mnogo manje gena (23).

Osim jezgrine DNK, svaka stanica sadržava kružnu dvolančanu DNK veličine 16,6 kb, nazvanu mitohondrijska DNK (engl. *mitochondrial DNA*, mtDNA). Mitohondrijska DNA kodira 37 gena, od čega je 13 gena za sintezu polipeptida uključenih u proces oksidativne fosforilacije (24).

### 1.3. Klasifikacija nasljednih bolesti

Fenotip svakog pojedinca određen je unutarnjim, naslijeđenim faktorima (genotipom) te nizom vanjskih, okolišnih čimbenika. Neke, naoko isključivo nasljedne bolesti, mogu biti modificirane vanjskim čimbenicima, te posljedično imati uvelike varijabilan fenotip. Primjer takve bolesti je fenilketonurija, uzrokovana mutacijom u genu za enzim fenilalanin hidroksilazu (PAH). Defektan enzim PAH ne može oksidirati aminokiselinu fenilalanin u tirozin, pa dolazi do nakupljanja fenilalanina i njegovih metabolita u tkivima. Nakupljanje fenilalanina uzrokuje trajna oštećenja mozga. Uklonimo li u prvim danima života aminokiselinu fenilalanin iz prehrane, dijete će se razvijati bez poteškoća (25).

Nasljedne bolesti dijelimo na kromosomske anomalije, monogenske nasljedne bolesti koje slijede Mendelove zakone, monogenske bolesti koje ne slijede Mendelove zakone i poligenске nasljedne bolesti (25, 26)

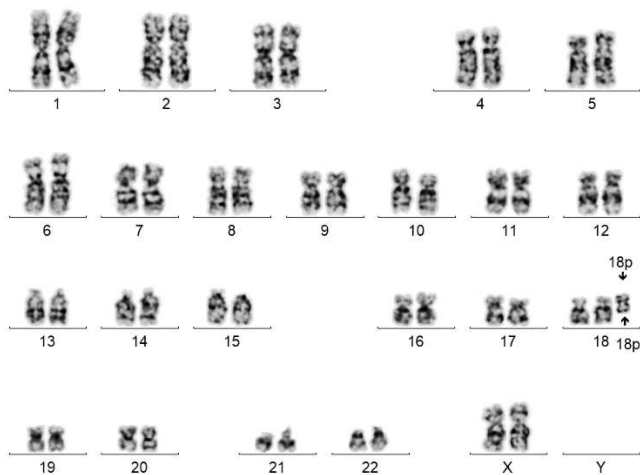
#### 1.3.1. Kromosomske anomalije

Kromosomske anomalije dijelimo na numeričke i strukturne. Za numeričke anomalije se vjeruje da nastaju kao rezultat nerazdvajanja kromosoma tijekom mejoze. Rezultat nerazdvajanja jest jajna stanica ili spermij koja posjeduje kromosom viška ili taj kromosom nedostaje. Nerazdvajanje kromosoma može se dogoditi i u ranim mitotičkim diobama zigote, pa nastaju populacije stanica različitog genotipa. Taj se fenomen naziva mozaicizmom. Fenotip mozaičnih pojedinaca ovisi o konačnom omjeru zdravih i aneuploidnih stanica. Najčešće numeričke anomalije autosomnih kromosoma su trisomija 21 (sindrom Down), trisomija 18 (sindrom Edwards) te trisomija 13 (sindrom Patau). Monosomije autosomnih kromosoma letalne su intrauterino, pa ih stoga ni ne susrećemo u populaciji.

Numeričke anomalije spolnih kromosoma očituju se blažim poremećajima u fenotipu od anomalija autosoma. Blaži poremećaji se mogu djelomično objasniti fenomenom inaktivacije X kromosoma u ženskim somatskim stanicama. Proces inaktivacije X kromosoma se naziva i lajonizacija (engl. *lyonization*) po britanskoj genetičarki Mary Lyon koja ga je prva opisala 1961. godine. Inaktivni X kromosom svjetlosnim se mikroskopom može vidjeti na rubu stanične jezgre u obliku gusto kondenziranog kromatina nazvanog Barrovo tjelešće. Smatra se da se lajonizacija događa nasumično, što znači da neke stanice imaju inaktiviran X kromosom paternalnog podrijetla, dok druge imaju inaktiviran X kromosom maternalnog podrijetla. Najčešće gonosomske aberacije su: Turnerov sindrom (45, X0), Klinefelterov sindrom (47, XXY), sindrom triplo X (47, XXX) i 47, XYY sindrom (26).



Strukturne anomalije pojavljuju se češće u populaciji od numeričkih anomalija. Strukturne anomalije uključuju translokacije, delecije, insercije, duplikacije i inverzije. Translokacija jest prijenos dijela genetičkog materijala s jednog kromosoma na drugi, a nastaju zbog lomova u kromosomima te mogu biti balansirane i nebalansirane. Balansirane translokacije imaju očuvanu kromosomsku masu, a samim time i očuvan genom. Nebalansirane translokacije sadržavaju višak ili manjak kromosomske mase, te uzrokuju odstupanja u fenotipu. Balansirana recipročna translokacija nastaje zbog lomova dvaju nehomolognih kromosoma koji zatim zamjene mjesta svojih odlomljenih dijelova. Ukoliko se kromosomski lom dogodi u kodirajućem dijelu gena, očitovati će se fenotip koji je posljedica disfunkcije tog gena, iako je translokacija balansirana. Balansirana Robertsonova translokacija ili akrocentrična fuzija nastaje kada se dugi krakovi akrocentrika spoje. Kratki krakovi nemaju važno fenotipsko značenje pa se tijekom diobe stanice izgube. Nebalansiranu Robertsonovu translokaciju nalazimo u 5% slučajeva Downovog sindroma. Terminalna delecija je gubitak terminalnog dijela kromosoma. Izokromosom nastaje kada se centromera ne podijeli uzdužno na dvije sestrinske kromatide, nego poprječno, razdvajajući duge krakove od kratkih krakova (Slika 1). Izokromosom najčešće nastaje od dugih krakova X kromosoma, a kratki krakovi se izgube tijekom diobe stanice. Takvu anomaliju nalazimo u 10% žena s Turnerovim sindromom. Kromosomska inverzija nastaje kada se dogode dva loma na istom kromosomu, a zatim pri ponovnom spajanju krhotina zauzme obrnuti smjer. Ako lomovi nastaju na istoj strani centromere, inverziju zovemo paracentričnom, a ako nastaju na suprotnim stranama centromere, pericentričnom inverzijom. Ispoljavanje fenotipa ovisi o balansiranosti kromosomske mase (25, 26).



**Slika 1.** Prikaz klasičnog kariotipa: 47, XX, +i(18)(p10). Kod ove ispitanice pronađen je izokromosom nastao od kratkih krakova kromosoma 18. (Izvor: Arhiva Citogenetičkog laboratorija KBC-a Split)

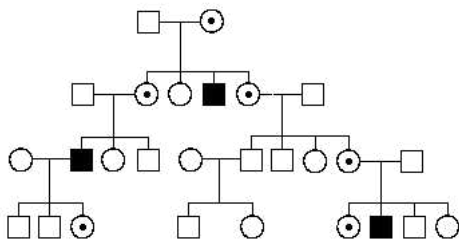
### 1.3.2. Mendelski nasljedne bolesti

Gregor Mendel je 1860-ih godina opisao svoja zapažanja i promjene prilikom križanja zelenog graška. Osobitosti promjena koje je uočio, danas možemo primijetiti i na drugim vrstama, pa tako i ljudima. Mendelski nasljedne bolesti mogu biti autosomno dominantne, autosomno recesivne te spolno vezane bolesti (26).

Autosomno dominantno svojstvo je ono svojstvo koje se očituje u heterozigotnom obliku. Autosomno dominantne bolesti prate vertikalni obrazac nasljeđivanja, odnosno prenosi se generacije na generaciju. Homozigoti za autosomno dominantnu nasljednu bolest mogu biti jednako ili teže pogođeni od heterozigota. Težina kliničke slike osobe s autosomno dominantnom bolesti može uvelike varirati. Stupanj očitovanja određenog fenotipa nazivamo ekspresivnost. Ekspresivnost nekog gena obilježje je svakog pojedinog nositelja mutiranog gena. Postotak ekspimiranog fenotipa kod osoba nositelja mutiranog gena nazivamo penetrantnost. Penetrantnost je obilježje određene populacije ili obitelji koji su nosioci mutiranog gena (25).

Autosomno recesivno svojstvo se očituje samo u homozigotnom obliku. Osobe, heterozigoti za određeno svojstvo nepogođeni su nosioci mutiranih alela. S obzirom da je učestalost recesivnih gena u genetskom bazenu vrlo niska, ispitivanjem obiteljske anamneze i rodoslovnog stabla često možemo otkriti da su roditelji oboljelih osoba u krvnom srodstvu, odnosno konsangvini (26).

X-vezane nasljedne bolesti nastaju zbog mutacija na X kromosomu. Mogu biti X-vezane recesivne te X-vezano dominantne bolesti. Fenotip X-vezano recesivnih bolesti nije eksprimiran kod žena. Žene su zdrave prenositeljice koje mogu prenijeti mutaciju na svoje potomstvo. Na Slici 2 vidimo primjer rodoslovlja s X-vezanom recesivnom bolesti. U prvoj i drugoj generaciji majke su heterozigotni zdravi prenositelji. 50% njihove ženske djece će biti zdravo, dok će 50% biti zdrave prenositeljice. Isto tako, polovina njihove muške djece biti će zdrava, a polovina će biti pogođena, odnosno biti će hemizigoti. U trećoj generaciji muškarac, oboljeli hemizigot, prenosi na s svoju kćeri mutirani alel, što znači da će sve kćeri biti zdravi heterozigoti. Oboljeli muškarac nikada ne može prenijeti mutirani alel na svoju mušku djecu. Ukoliko kod heterozigotnih žena dođe do neuobičajene lajonizacije, a samim time i pojačane inaktivacije X kromosoma s normalnim alelom, može doći do ispoljavanja fenotipa bolesti. U takvim se slučajevima radi o fenotipu slabije ekspresivnosti (25, 26).



**Slika 2.** Primjer rodoslovlja s X-vezanom recesivnom bolesti. (Slika dostupna na: <https://medicine.tamu.edu/class-files/webpath16/genhtml/genet054.htm>)

Kod X-vezano dominantnih bolesti, pogođeni mogu biti i muškarci i žene. Bolesna majka, heterozigot za mutirani alel, prenosi bolest na 50% svojih potomaka. Bolesni otac ne može prenijeti bolest na svoje sinove, dok će sve njegove kćeri biti bolesne. Primjer je X-vezane dominantne bolesti obiteljska hipofosfatemija (25).

### **1.3.3. Monogeniski nasljedne bolesti koje ne prate Mendelove zakone**

Mnoge monogenske nasljedne bolesti ne prate Mendelove zakone nasljeđivanja. Takve bolesti možemo svrstati u nekoliko kategorija: mitohondrijske nasljedne bolesti, dinamičke mutacije i bolesti kao posljedica unipateralne disomije i genomskog biljegovanja.

#### **1.3.3.1. Mitohondrijske bolesti**

Bolesti nastale mutacijama unutar mitohondrijskog genoma prenose se po tipu maternalnog nasljeđivanja. Mutacije mtDNK deset su puta učestalije od mutacija nuklearne DNK. Isti mitohondrij može sadržavati i normalnu i mutiranu mtDNK, što nazivamo heteroplazmijom. Heteroplazmija dovodi da različite eksprimiranosti patološkog fenotipa u različitim tkivima i organima. Težina kliničke slike također ovisi i o potrebi zahvaćenog tkiva za energijom te dobi nosioca mutacije. Zapaženo je da se s godinama života povećava udio mutiranih mtDNK, što dovodi i do kasnije pojave simptoma mitohondrijske bolesti. Do danas je opisano oko 50 mitohondrijskih nasljednih bolesti (24-26).

#### **1.3.3.2. Dinamičke mutacije**

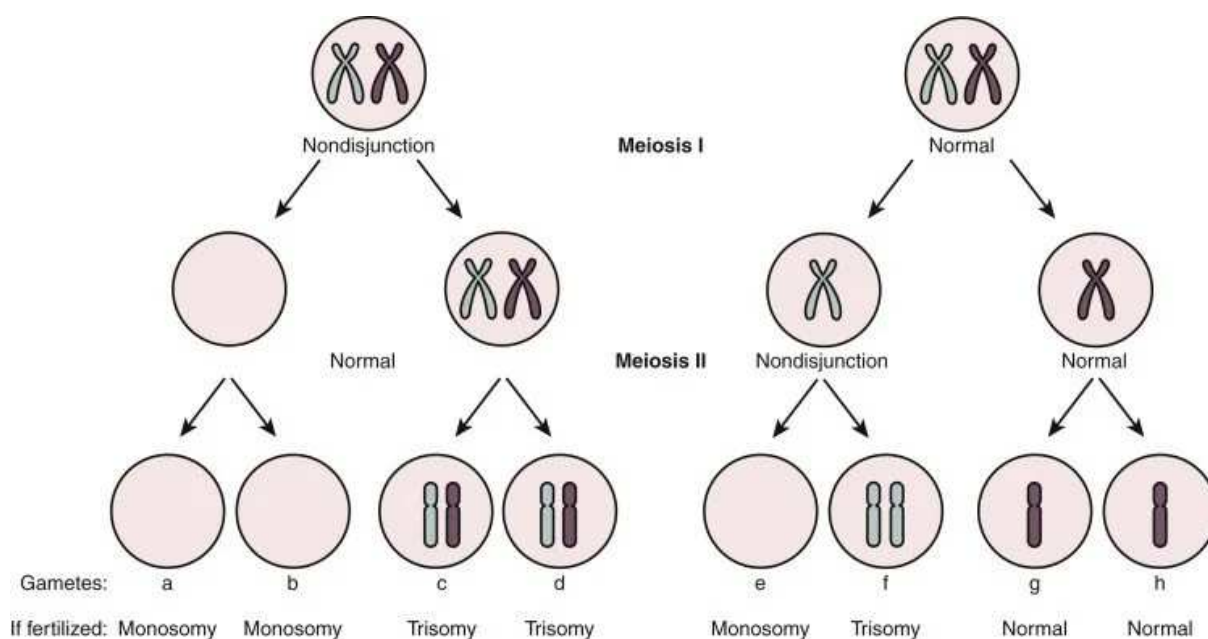
Ljudski genom sadržava mnogo repetitivnih sljedova DNK, a oni uglavnom čine nekodirajuće dijelove genoma. Dio repetitivnih sljedova smješteno je unutar gena i upravo su oni bitni za nastanak patoloških stanja. Relativno kratki sljedovi, do nekoliko desetaka trinukleotida, normalan su dio genoma. Ukoliko dođe do neprimjerenog produljivanja slijeda trinukleotida, dolazi do ekspresije fenotipa. Dinamičke su mutacije nestabilne te pokazuju sklonost produljivanju prijenosom iz generacije u generaciju. Ekspresivnost fenotipa u pravilu je u korelaciji s duljinom produljenog slijeda trinukleotida. Što je slijed duži, to je klinička slika teža te se očituje ranije u životnoj dobi. Taj fenomen nazivamo anticipacijom. Neki pojedinci imaju broj trinukleotida između normalnog i patološkog. Takve promjene nazivamo premutacijama, a one nose povećani rizik od produljivanja broja tripleta i ispoljavanja bolesti u potomstva (25, 26). Primjeri bolesti uzrokovanih dinamičkim mutacijama prikazani su u Tablici 4.

**Tablica 4.** Primjeri najpoznatijih bolesti uzrokovanih dinamičkim mutacijama

<b>Bolest</b>	<b>Gen odgovoran za bolest</b>	<b>Lokus gena</b>	<b>Trinukleotid</b>	<b>Patogeni broj ponavljanja</b>
Fragilni X sindrom	<i>FMRI</i>	Xq27.3	CGG	>200
Huntingtonova bolest	<i>HTT</i>	4p16.3	CAG	>37
Friedrichova ataksija	<i>FXN</i>	9q21.11	GAA	70-1300

### 1.3.3.3. Uniparentalna disomija i genomsko biljevanje

Unipateralna disomija je pojava kada neka osoba nosi oba homologna kromosoma naslijeđena od samo jednog roditelja, a ne po jedan kromosom od svakog kako je normalno. Na Slici 3. možemo vidjeti dva moguća mehanizma nastanka uniparentalne disomije. Ako u mejozi I dođe do nerazdvajanja homolognih kromosoma, a zatim se u mejozi II sestrinske kromatide obaju kromosoma razdvoje, te se gameta označena slovom c ili d oplodi, dolazi do nastanka zigote koja je trisomična za taj kromosom. Pretpostavlja se da ako uslijedi gubitak kromosoma drugog roditelja, dolazi do fenomena uniparentalne heterodisomije. Ukoliko u mejozi II ne dođe do razdvajanja sestrinskih kromatida, a gameta označena slovom f se oplodi, dolazi do nastanka zigote s trisomijom tog kromosoma. Ukoliko dođe do gubitka kromosoma drugog roditelja, tu pojavu nazivamo uniparentalna izodisomija. Naziv heterodisomija upućuje na naslijeđena dva različita homologa, dok izodisomija upućuje na naslijeđene dvije kopije istog homolognog kromosoma (25-27).



**Slika 3.** Uniparentalna disomija. Slika prikazuje nastanak heterodisomije te izodisomije u gametama. (Slika dostupna na: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9781416049074000310-gr7.jpg>)

Genomsko biljegovanje ili utiskivanje (engl. *genomic imprinting*) epigenetska je pojava pri kojoj fenotip nekog gena ovisi o tome je li taj gen naslijeđen od oca ili majke. Genomsko biljegovanje posredovano je metilacijom DNK tijekom gametogeneze, a prolazi ga samo mali dio gena. Do danas je poznato 228 utisnutih ljudskih gena (27).

Primjeri uniparentalne disomije i genomskog biljegovanja su Prader-Willijev i Angelmanov sindrom, te Berckwith-Wiedemannov i Russel-Silverov sindrom (25).

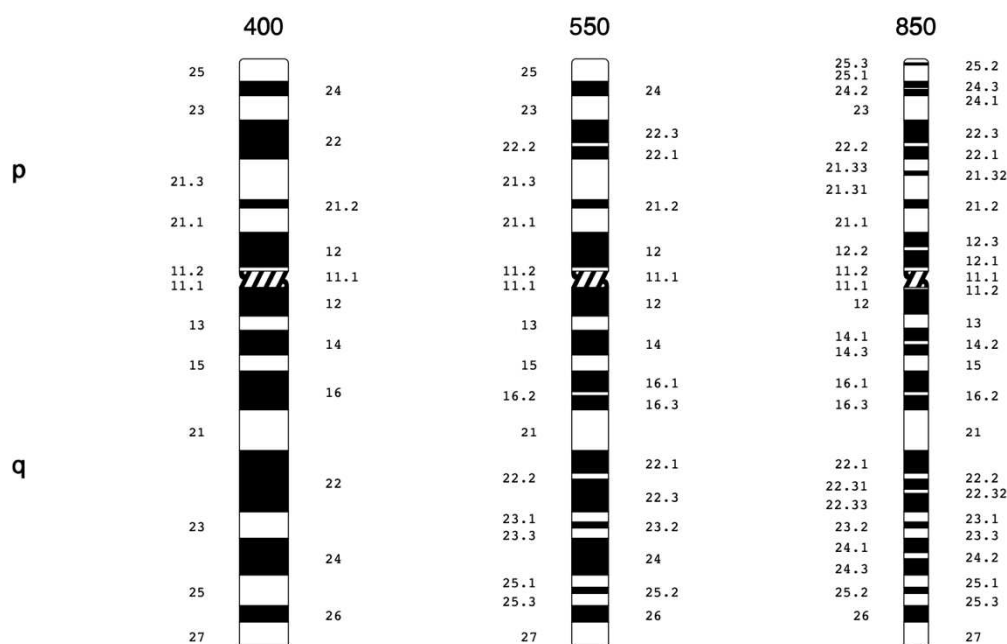
### 1.3.4. Multifaktorske nasljedne bolesti

Multifaktorske bolesti predstavljaju veliku skupinu bolesti koje vjerojatno nastaju zbog djelovanja više gena, ali i okolišnih čimbenika. Iako se svaki od gena nasljeđuje mendelski, konačna bolest koja nastaje zbrajanjem učinka svih gena ne prati Mendelove zakone nasljeđivanja. Takve gene nazivamo dispozicijskim genima. Pretpostavka je da svaki od tih gena nije dovoljno jak da se samostalno očituje u fenotipu, ali kumulativno s drugim genima može dovesti do ekspresije patološkog fenotipa. Budući da su genetski i okolišni faktori u multifaktorskim bolestima često nepoznati, nije moguće izračunati rizik od ponavljanja bolesti u određenoj obitelji. Generalno se može zaključiti da je bliska rodbina u većem riziku od ponavljanja bolesti, što je fenotip bolesti teži (25, 26).

## 1.4. Klasična i molekularna citogenetika

### 1.4.1. Klasična kariotipizacija

Klasična kariotipizacija morfološki je prikaz svih somatskih kromosoma u metafazi stanične diobe. Za analizu se najčešće koriste kultivirani limfociti periferne krvi, ali se mogu koristiti i kultivirani fibroblasti iz bioptata kože, stanične koštane srži, stanice kulture amnijske tekućine ili stanice bioptata korionskih resica. Stanice se najčešće boje posebnom tehnikom po Giemsi, G-pruganje. Rutinski kariogram prikazuje oko 400-550 kromosomskih pruga koje se prema međunarodnom dogovoru (engl. *the International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, ISCN) numeriraju od centromere prema periferiji (Slika 4). Razlučivost pruga može se povećati i do 850 posebnim metodama prikaza kromosoma u prometafazi (22).



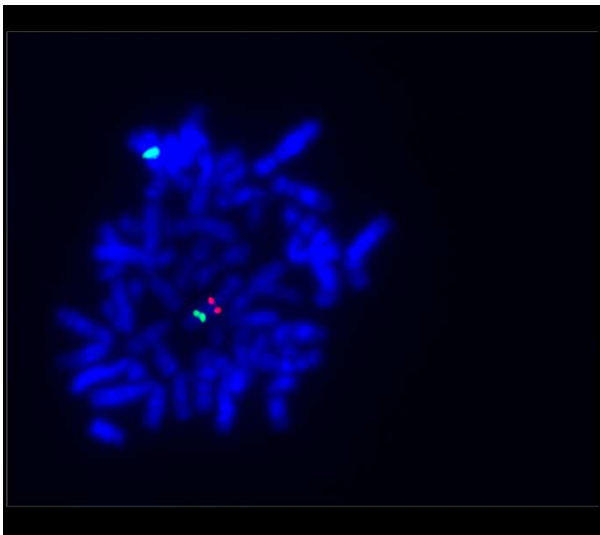
**Slika 4.** Prikaz ideograma kromosoma 6 s ISCN numeriranjem u različitim rezolucijama pruga.

(Slika dostupna na:

<http://www.pathology.washington.edu/research/cytopages/idiograms/human/>)

### 1.4.2. Fluorescentna in situ hibridizacija

Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) metoda je molekularne citogenetike kojom se mogu otkriti submikroskopske promjene kromosoma. Temelji se na spajanju kratkih fluorescentno obilježenih DNK sonda s komplementarnim slijedom ispitivane DNK. Rezultati se potom očitavaju upotrebom fluorescentnog mikroskopa (Slika 5). Prednost je ove metode mogućnost primjenjivanja i na stanicama u interfazi, što, za razliku od klasične kariotipizacije, znatno ubrzava dobivanje rezultata. Razlikujemo centromerne sonde, jedinstvene sonde specifične za cijeli ili dio kromosoma, te sonde za mala područja eukromatina. FISH tehnikom također možemo pregledati i cijeli genom metodom višebojne kariotipizacije, kojom se mogu otkriti mnogo manje promjene koje nisu vidljive klasičnom kariotipizacijom (22, 25).



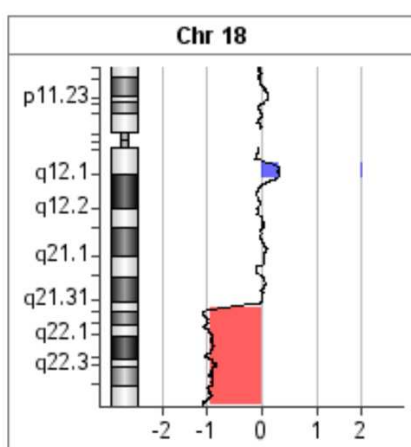
**Slika 5.** Rezultati FISH-a na metafaznim kromosomima za sindrom Williams-Beuren. Na slici se vide dva kontrolna zelena signala koji označavaju sondu za kromosom 7 te samo jedan crveni signal koji obilježavaju ELN gen (7q11.23). Nedostatak drugog crvenog signala označava mikodeleciju u regiji 7q11.23, što je patognomonično za sindrom Williams-Beuren. (Izvor: Arhiva Citogenetičkog laboratorija KBC-a Split)

### 1.4.3. Kromosomski microarray

Kromosomski microarray (engl. *chromosomal microarray analysis*, CMA) metoda je molekularne citogenetike koja detektira promjene u broju DNK kopija (engl. *copy number variants*, CNV). CMA ujedinjuje dvije tehnologije: komparativnu genomsku hibridizaciju i microarray polimorfizma jednog nukleotida (28).



Komparativna genomska hibridizacija (engl. *comparative genomic hybridization*, CGH) uspoređuje ispitivanu DNK s normalnom kontrolnom DNK. Oba uzorka se fragmentiraju i bojaju dvjema fluorescentnim bojama, te se potom u jednakim omjerima postavljaju na staklene ili silikonske matrice (engl. *CGH array*) koje sadržavaju mnogobrojne predefinirane DNK probe. Obje fragmentirane DNK se kompetitivno vežu za komplementarne probe matrice. Intenzitet fluorescencije zatim se očitava posebnim digitalnim programima. Rezultat se prikazuje kao omjer hibridizacije ispitivane i kontrolne DNA (25, 28). Omjer veći od 1 upućuje na duplikaciju, dok omjer manji od 1 upućuje na deleciju (Slika 6).



**Slika 6.** Prikaz rezultata CMA ispitanika s mikrodelecijom i mikroduplikacijom na kromosomu 18. Kod ovog ispitanika mikroduplikacija je klasificirana kao VUS, a mikrodelecija kao patogena varijanta. (Izvor: Arhiva Citogenetičkog laboratorija KBC-a Split)

Microarray polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) koristi matrice oligonukleotida visoke gustoće. Za odabrane probe je poznato da pokazuju varijacije za jedan par baza među pojedincima. Za razliku od CGH microarray-a, na matricama SNP microarray-a hibridizira se samo ispitivana DNK, te se mjeri apsolutna fluorescencija koja se potom uspoređuje s kontrolnim matricama (28, 29).

CMA može detektirati promjene od 50-100 Kb, dok klasična kariotipizacija može prikazati delecije i duplikacije veličine 5-10 Mb. Promjene CNV-ova interpretiraju se kao patogene, vjerojatno patogene, nejasnog značenja (engl. *variants of uncertain significance*, VUS), vjerojatno benigne i benigne, prema smjernicama Američkog koledža za medicinsku genetiku i genomiku (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*, ACMG). Patogene i vjerojatno patogene varijante broja kopija smatraju se značajnima za etiologiju poremećaja (30-32).

#### **1.4.4. Sekvenciranje sljedeće generacije**

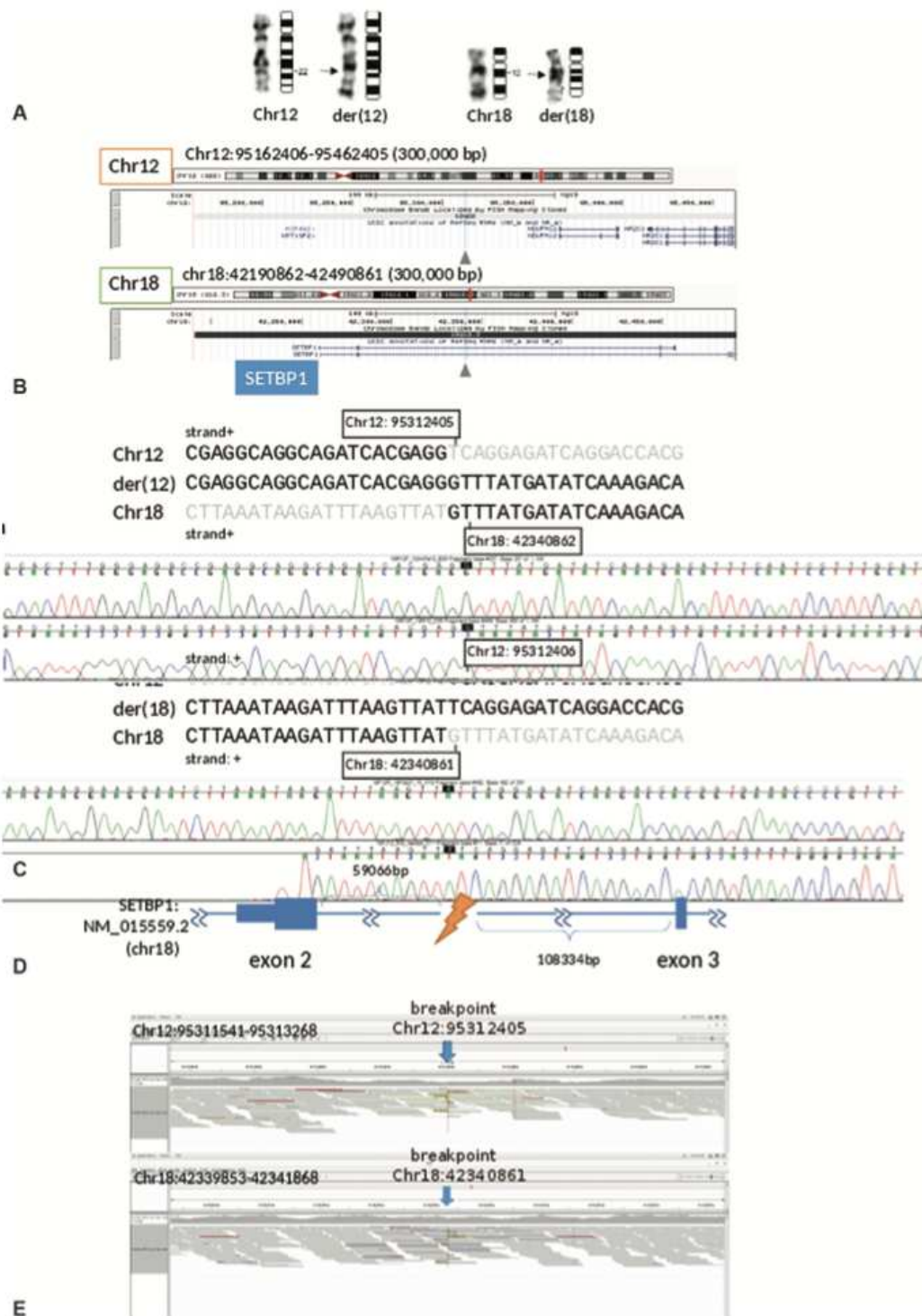
Sekvenciranje sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) ili masivno paralelno sekvenciranje genetičke su metode koje su napravile revoluciju u genetskim istraživanjima te zamijenile tradicionalno sekvenciranje po Sangeru. NGS paralelno sekvencira DNK na milijune malih fragmenata, koji se potom mapiraju i uspoređuju s kontrolnim genomom. NGS su metode ciljani paneli gena, sekvenciranje cijelog egzoma (engl. *whole exome sequencing*, WES) i sekvenciranje cijelog genoma (engl. *whole genome sequencing*, WGS) (33, 34).

Varijante gena dobivene sekvenciranjem sljedeće generacije interpretiraju isto kao i varijante kopija gena: patogene, vjerojatno patogene, varijante nejasnog značenja (engl. *variant of uncertain significance*, VUS), vjerojatno benigne te benigne. ACMG i Američko udruženje za molekularnu patologiju (engl. *American Association for Molecular Pathology*, AMG) postavili su smjernice i preporuke za interpretaciju genskih varijanti za genetske laboratorije i kliničke genetičare. Pronalazak patogene ili vjerojatno patogene varijante gena smatra se potvrdom genetske etiologije poremećaja (35, 36).

NGS koristi se kada drugim genetičkim istraživanjima nije potvrđena klinička dijagnoza, a postoji osnovana sumnja na genetsku etiologiju poremećaja. Pri dijagnostici neurorazvojnih poremećaja, dijagnostički doprinos (engl. *diagnostic yield*) metoda NGS-a, u različitim studijama, iznosio je 16-50% (2, 35).

Paneli gena koriste se za dijagnosticiranje poremećaja koji imaju moguću genetsku etiologiju. Sadržavaju gene koji su povezani ili se sumnja da su povezani s određenim poremećajem ili skupinom poremećaja, primjerice paneli gena za epilepsiju (36).

Slika 7. prikazuje rezultate sekvenciranja cijelog genoma kod ispitanika s poremećajem govora te intelektualnim i bihevioralnim poteškoćama. Kod ispitanika je primarno klasičnom kariotipizacijom pronađena prividno balansirana translokacija 46, XY, t(12;18)(q22;q12.3) nastala *de novo* (A). Potom je učinjen WGS pri kojem se pronađe disrupcija u intronu 2 gena *SETBP1* (B-E). Gubitak funkcije (engl. *loss of function*, LOF) *SETBP1* gena dovodi do autosomno dominantnog intelektualnog odstupanja, tip 29.



**Slika 7.** Prikaz rezultata sekvenciranja cijelog genoma ispitanika s prividno balansiranom translokacijom.

(Izvor: Vrkic Boban I, Sekiguchi F, Lozic M, Miyake N, Matsumoto N, Lozic B. A novel SETBP1 gene disruption by a de novo balanced translocation in a patient with speech impairment, intellectual and behavioral disorder. *Pediatr Genet.* 2020)

## **2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

## **2.1. Ciljevi istraživanja**

1. Odrediti učestalost pojedinih neurorazvojnih poremećaja kod ispitanika upućenih na genetičko testiranje.
2. Odraditi udio ispitanika s neurorazvojnim poremećajem kojima je nekom od metoda genetičkog testiranja dokazana promjena u genomu.
3. Odrediti dijagnostički doseg pojedinih metoda genetičkog testiranja.
4. Odrediti udio ispitanika kojima je dokazana promjena u genomu, a pored neurorazvojnog poremećaja u fenotipu imaju pridruženu dismorfiju lica, razvojnu anomaliju mozga ili druge kongenitalne anomalije.
5. Usporediti dijagnostičke dosege pojedinih metoda genetičkog testiranja s dostupnom literaturom.

## **2.2. Hipoteza**

Veći dijagnostički doseg imati će novije metode genetičkog testiranja poput CMA i sekvenciranja sljedeće generacije, te njima treba davati prednost pri utvrđivanju genetičke etiologije neurorazvojnih poremećaja.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Ispitanici**

U razdoblju od 1. siječnja 2016. do 31. prosinca 2019. pri Citogenetskom laboratoriju i Ambulanti medicinske genetike KBC-a Split, obrađeno je 207 ispitanika upućenih na genetičko testiranje od strane neuropedijatara pod dijagnozom nekog od neurorazvojnih poremećaja.

Kriteriji uključenja: Uključeni su svi ispitanici s neurorazvojnim poremećajima koji su bili testirani klasičnom citogenetikom, FISH-om, CMA i nekom od metoda NGS-a.

Kriteriji isključenja: Isključeni su ispitanici sa sindromom Down, Edwards, Patau i Turner, ispitanici s izoliranim oštećenjima vida i sluha, te ispitanici s neuromuskularnim bolestima.

### **3.2. Ustroj istraživanja**

Provedeno je retrospektivno presječno istraživanje.

### **3.3. Etička načela**

Plan istraživanja usklađen je s odredbama o zaštiti prava i osobnih podataka ispitanika iz Zakona o zaštiti prava pacijenata (NN169/04) te odredbama Kodeksa liječničke etike i deontologije (NN55/08, 139/15) i pravilima Helsinške deklaracije WMA 1964-2013 na koje upućuje Kodeks. Studija je odobrena rješenjem pod brojem 2181-147/01/06/M.S.-21-02.

### **3.4. Opis istraživanja**

Retrospektivnom analizom medicinske dokumentacije izdvojeni su podaci o dobi, spolu, tipu neurorazvojnih poremećaja, provedenom genetičkom testiranju, prisutnosti dismorfije, razvojnih anomalija mozga i drugih kongenitalnih anomalija te genotipu. Ispitanici su podijeljeni u tri skupine s obzirom na dotad provedeno genetičko testiranje: ispitanici s potvrđenim promjenama u genomu, ispitanici kojima nijednom metodom nisu dokazane promjene u genomu te ispitanici koji su u procesu genetičke obrade. Određena je dob prilikom dijagnoze genetskog poremećaja. Utvrđen je dijagnostički doseg (engl. *diagnostic yield*) pojedinih metoda genetičkog testiranja. Prikazani su rezultati pojedinih genetičkih testova te utvrđen njihov značaj za fenotip pojedinih ispitanika. Utvrđena je učestalost dismorfije lica, razvojnih anomalija mozga te kongenitalnih anomalija drugih organskih sustava. Dobiveni podaci uspoređeni su s literaturom.



### **3.5. Statistička analiza podataka**

Statistička analiza provedena je softverskim paketom SPSS for MacOS (verzija 28.00, IBM Corp., Armonk, NY, USA) i Microsoft Excel za MacOS 11.5.2 (Microsoft Corporation). Fisher's exact testom određena je razlika u dijagnostičkim dosezima ovog istraživanja s dijagnostičkim dosezima drugih studija. Rezultati su se interpretirali na razini značajnosti  $p \leq 0,05$ .

#### **4. RESULTATI**

U istraživanje je uključeno 207 ispitanika s dijagnozom neurorazvojnih odstupanja koji su genetički testirani. Za 97 ispitanika dobiven je pozitivan rezultat genetičkog testa, za 44 ispitanika negativan rezultat, a za 66 ispitanika rezultati su u izradi. Raspodjela ispitanika prema broju i spolu u skupinama prikazana je u Tablici 5.

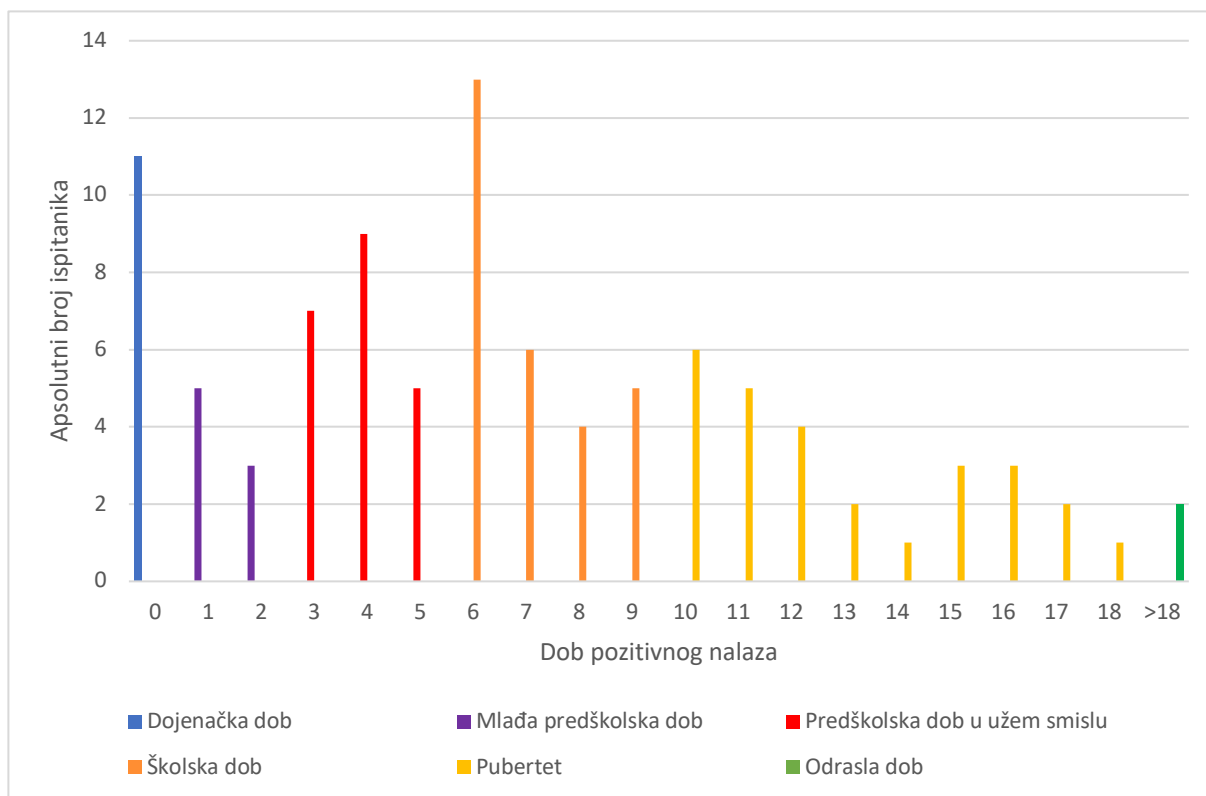
**Tablica 5.** Prikaz ispitanika prema broju i spolu u skupinama

<b>Karakteristika skupine</b>	<b>Pozitivan rezultat</b>	<b>Negativan rezultat</b>	<b>Rezultat u izradi</b>	<b>Ukupno</b>
Broj ispitanika	97 (46,9%)	44 (21,3%)	66 (31,8%)	207 (100%)
Spol* M/Ž No (%)	48 (49,5%)/49	27 (61,4%)/17	38 (57,6%)/28	113 (54,6%)/94

\* M-muško; Ž-žensko

Najveći je udio ispitanika s pozitivnim rezultatom genetičkog testiranja (46,9%). Raspodjela ispitanika prema spolu pokazala je nešto više ispitanika muškog spola u skupinama s negativnim (61,4%) i rezultatom u izradi (57,6%), dok je u skupini s pozitivnim rezultatom udio ispitanika muškog spola nešto niži (49,5%).

Na Slici 8. prikazan je graf dobne distribucije pri kojoj je dobiven pozitivan rezultat genetičkog ispitivanja. Medijan dobi pri dijagnozi je 6 godina. Najveći udio ispitanika dijagnosticiran je u školskoj dobi.



**Slika 8.** Grafički prikaz dobne distribucije pri kojoj je dobiven pozitivan rezultat genetičkog testa.

U Tablici 6. prikazana je distribucija ispitanika prema kliničkoj dijagnozi zbog koje su ispitanici upućeni na genetičko testiranje. Pod dijagnozom višestrukih poremećaja ubrojani su pacijenti kojima je postavljena dijagnoza više od jednog neurorazvojnog poremećaja. Kod 79 (38,2%) ispitanika s višestrukim neurorazvojnim poremećajima, najviše ispitanika, njih 26 (32,9%) imalo je dijagnozu GDD-a i epilepsije.

**Tablica 6.** Distribucija ispitanika prema klasifikaciji neurorazvojnog poremećaja

Dijagnoza	Pozitivan rezultat	Negativan rezultat	Rezultat u izradi	Ukupno
ID	0	2	1	3 (1,5%)
GDD	37	11	17	65 (31,4%)
Poremećaji govora i komunikacije	4	4	2	10 (4,8%)
PDD	3	11	10	24 (11,6%)
ADHD	4	2	0	6 (2,9%)
Poremećaji učenja	1	3	0	4 (1,9%)
Motorički poremećaji	6	2	4	12 (5,8%)
Epilepsija i epileptički sindromi	4	0	0	4 (1,9%)
Višestruki poremećaji	38	9	32	79 (38,2%)
Ukupno	97	44	66	207 (100%)

ID-engl. *intellectual disability*; GDD-engl. *global developmental disorder*; PDD-engl. *pervasive developmental disorder*; ADHD-engl. *attention deficit and hyperactivity disorder*

U Tablici 7. prikazani su dijagnostički dosezi korištenih genetičkih testova. Dijagnostički doseg označava omjer pozitivnih i ukupno učinjenih testova kod ispitanika s neurorazvojnim poremećajima.

**Tablica 7.** Dijagnostički doseg korištenih testova

Genetički test	Pozitivni test	Ukupno	Dijagnostički doseg
Klasična kariotipizacija	20	207	9,7%
FISH	13	19	68,4%
CMA	53	121	43,8%
ES	8	11	72,7%
WGS	1	1	100%
Panel gena za epilepsiju	17	30	56,7%
Analiza <i>FMRI</i> gena	3	70	4,3%

FISH-fluorescentna *in situ* hibridizacija; CMA-engl. *chromosomal microarray*; ES-engl. *exome sequencing*; WGS-engl. *whole genome sequencing*

Klasičnom kariotipizacijom pronađeno je 20 patoloških nalaza, od čega 7 (35%) numeričkih te 13 (65%) strukturnih anomalija kromosoma. Od strukturnih anomalija pronađene su 2 inverzije, 7 delecija, 2 translokacije te 2 duplikacije.

Molekularnom metodom FISH od 13 pozitivnih nalaza, 6 (46,2%) ispitanika je imalo prethodno patološki nalaz klasične kariotipizacije, što dovodi do korekcije dijagnostičkog dosega na 36,8%. Najčešće postavljena dijagnoza bila je Williams-Beurenov sindrom kod 3 (23,1%) ispitanika.

CMA testiranjem pronađena su 53 pozitivna nalaza, od čega ih je 34 (64,2%) klasificirano kao patogeno, 4 (7,5%) vjerojatno patogeno te 12 (22,6%) varijanti nejasnog značenja. Kod 2 ispitanika pronađena je istodobno patogena te varijanta nejasnog značenja, a kod jednog ispitanika po jedna vjerojatno patogena te patogena varijanta. Isključivanjem varijanti nejasnog značenja, dolazimo do dijagnostičkog dosega od 33,9%.

U Tablici 8. prikazani su neki od ispitanika kojima je pronađena patogena ili vjerojatno patogena varijanta broja kopija u genomu te geni koji su odgovorni za nastanak neurorazvojnog poremećaja.

**Tablica 8.** Prikaz 10 ispitanika s patogenim/vjerojatno patogenim varijantama broja kopija u genomu

No	Varijanta broja kopija	Klasifikacija varijante	Neurorazvojni poremećaj	Gen odgovoran za poremećaj
1	(18p11.32p11.21)x4, (18q11.1)x4	patogena	GDD	?
2	(16p12.2)x1	patogena	GDD, epilepsija	<i>UQCRC2</i>
3	(Xp11.3)x3	patogena	PDD	<i>ZNF674</i>
4	(15q13.3)x1	vjerojatno patogena	GDD	<i>CHRNA7</i>
5	(16p11.2)x1	vjerojatno patogena	GDD, PDD	<i>TUFM</i>
6	(9p24.3)x1	patogena	GDD	<i>DOCK8</i>
7	(15q13.1q13.2)x3	vjerojatno patogena	poremećaj govora i komunikacije	<i>APBA2</i>
8	(16p13.11)x3	patogena	ADHD, poremećaj govora i komunikacije	<i>NDE1</i>
9	(22q13.2q13.33)x1	patogena	GDD	<i>SHANK3</i>
10	(8p22p21.3)x3	vjerojatno patogena	GDD, epilepsija	<i>PSD3</i>

GDD-engl. *global developmental disorder*; PDD-engl. *pervasive developmental disorder*; ADHD-engl. *attention deficit and hyperactivity disorder*

Od 53 ispitanika s pozitivnim nalazom CMA, kod 32 (60,4%) pronađena je mikrodelecija, kod 14 (26,4%) mikroduplicacija, a kod 7 (13,2%) ispitanika pronađene su dvije ili više varijanti broja kopija, tj. CNV-ova (Tablica 9).

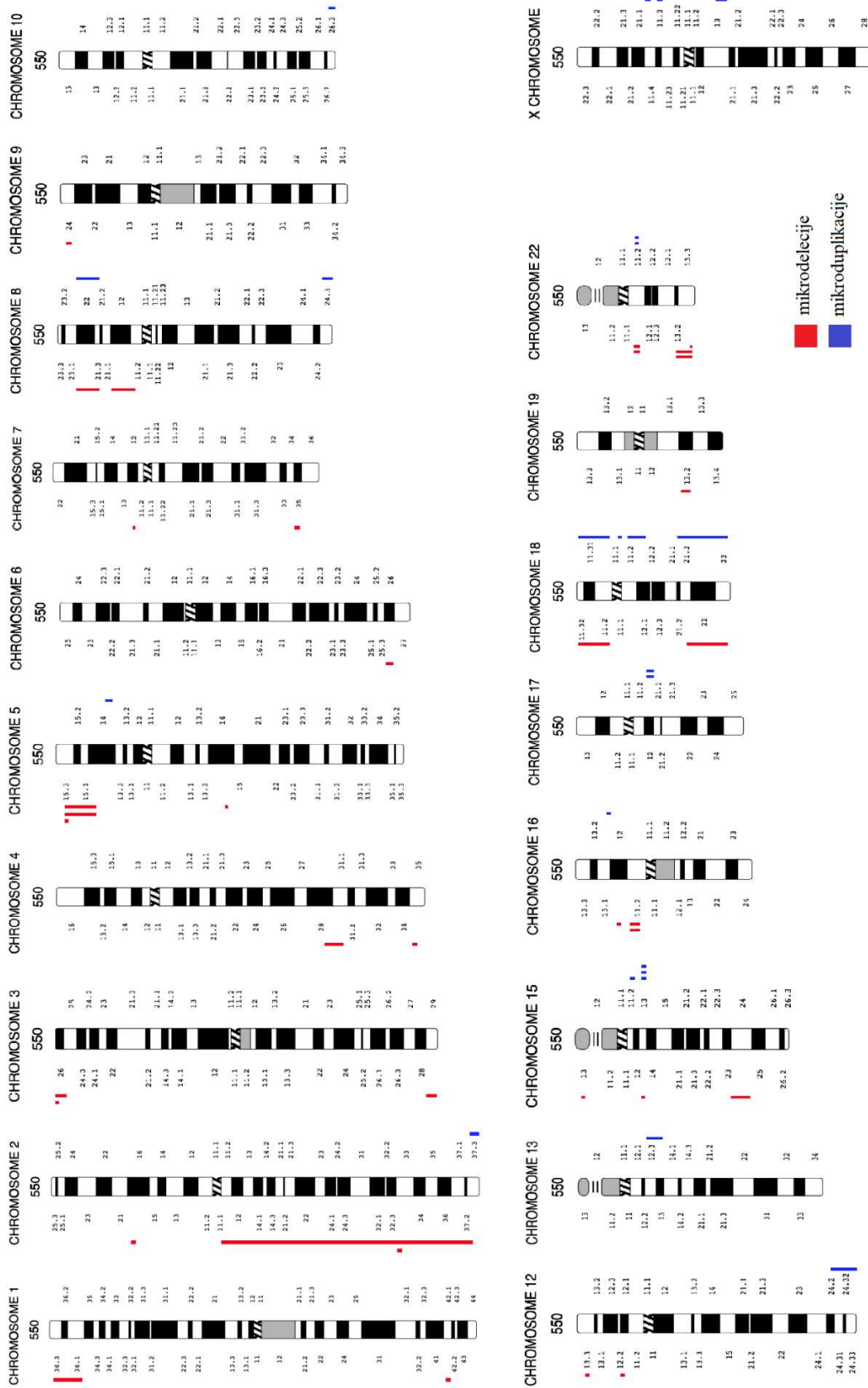
**Tablica 9.** Prikaz ispitanika s više od dvije varijante broja kopija u genomu

No	Varijanta broja kopija (CNV)	Klasifikacija varijante	Neurorazvojni poremećaj	Gen/i odgovorni za poremećaj
1	(2q37.3)x3, (Xq13.2q13.3)x3	patogene	GDD	HDAC4
2	(15q24.2)x1, (22q11.21)x3	patogene	GDD, ADHD	?
3	(18q11.2q12.1)x3, (18q21.31q23)x1	VUS, patogena	GDD	?
4	(5p15.33p14.2)x1, (5p14.2p14.1)x3	patogena, VUS	GDD	?
5	(10q26.3)x1, (12q24.21q24.33)x3	vjerojatno patogena, patogena	Epilepsija	?
6	(8q24.3)x3, (22q11.21)x3	patogene	GDD	?
7	(12p13.33p13.32)x1, (18q21.22q23)x3	patogene	GDD	?

VUS-engl. *variant of uncertain significance*; GDD-engl. *global developmental disorder*; ADHD-engl. *attention deficit and hyperactivity disorder*, CNV-engl. *Copy number variant*

Na Slici 9. prikazan je ideogram kromosoma na kojima su kromosomskim microarray-om pronađene varijante broja kopija. Crvenom bojom označene su mikrodelecije, a plavom mikroduplicacije. Najviše se CNV-ova nalazi na kromosomima 15 i 22.





**Slika 9.** Prikaz ideograma kromosoma s obilježenim lokusima na kojima su pronađene varijante broja kopija. (Ideogram kromosoma preuzet s: <http://www.pathology.washington.edu/research/cytopages/idiograms/human/>)

U Tablici 10. prikazani su pozitivni rezultati sekvenciranja egzoma. Od 8 pozitivnih rezultata, pronađeno je 5 (62,5%) patogenih mutacija, 2 (25%) vjerojatno patogene te 1 (12,5%) mutacija kao varijanta nejasnog značenja.

**Tablica 10.** Rezultati sekvenciranja egzoma

No	Gen	Genski lokus	Klasifikacija varijante gena	Poremećaj
1	<i>DHCR7</i>	11q13.4	patogena	Smith-Lemli-Opitz sindrom
2	<i>TAF1</i>	Xq13.1	patogena	X-vezano intelektualno zaostajanje, tip 33
3	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	patogena	Epileptička encefalopatija, rana infantilna, tip 44
4	<i>HRAS</i>	11p15.5	patogena	Sindrom Costello
5	<i>TNPO3</i>	7q32.1	patogena	AD <i>limb-girdle</i> mišićna distrofija, tip 2
6	<i>LZTR1</i>	22q11.21	vjerojatno patogena	Sindrom Noonan, tip 10
7	<i>AGO2</i>	8q24.3	vjerojatno patogena	AD tip 2
8	<i>COL4A1</i>	13q34	VUS	

VUS-engl. *variant of uncertain significance*

Kod jednog ispitanika, prevedeno je cijelogenomsko sekvenciranje (engl. *whole genome sequencing*, WGS). Ispitaniku je primarno klasičnom kariotipizacijom pronađena *de novo* nastala, prividno balansirana translokacija (46,XY,t(12;18)(q22;q12.3), a potom je WGS-om dokazana disrupcija u genu *SETBP1* koja uzrokuje autosomno dominantno intelektualno zaostajanje, tip 29 (Slika 7.)

U tablici 11. prikazani su pozitivni rezultati panela gena za epilepsiju. Od 17 pozitivnih rezultata, 5 (29,4%) mutacija klasificirane su kao patogene, 4 (23,5%) vjerojatno patogene, te 8 (47,1%) kao varijante nejasnog značenja.

**Tablica 11.** Rezultati panela gena za epilepsiju

No	Gen	Genski lokus	Klasifikacija varijante gena	Poremećaj
1	<i>EFHC1</i>	6p12.2	patogena	Mioklona juvenilna epilepsija
2	<i>TSC1</i>	9q34.13	patogena	Tuberozna skleroza, tip 1
3	<i>NRXN1</i> , <i>CNTNAP2</i>	2p16.3, 7q35-q36	patogena	Pitt-Hopkins-like sindrom, tip 2 i 1
4	<i>RELN</i>	7q22.1	patogena	Familijarna epilepsija temporalnog režnja, tip 7
5	<i>BCAP31</i> , <i>MT-ATP6</i>	Xq28, mtDNK	patogene	
6	<i>FLNA</i>	Xq28	vjerojatno patogena	
7	<i>ASPM</i>	1q31.3	vjerojatno patogena	AR mikrocefalija, tip 5
8	<i>MBD5</i>	2q23.1	vjerojatno patogena	AD intelektualno zaostajanje, tip 1
9	<i>TSC2</i>	16q13.3	vjerojatno patogena	Tuberozna skleroza, tip 2
10	<i>SCN1A</i>	2q24.3	VUS	
11	<i>KCNJ10</i>	1q23.2	VUS	
12	<i>ADGRV1</i>	5q14.3	VUS	
13	<i>SCN9A</i>	2q24.3	VUS	
14	<i>SCN3A</i>	2q24.3	VUS	
15	<i>ADSL</i>	22q13.1	VUS	
16	<i>SCN1A</i>	2q24.3	VUS	
17	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	VUS	

VUS-engl. *variant of uncertain significance*

Analizom *FMRI* gena, kod 3 ispitanika pronađena je puna mutacija (>200 ponavljanja CGG trinukleotida), dok je kod još troje ispitanika pronađena premutacija gena (55-200 ponavljanja CGG trinukleotida).

Dijagnostički dosezi pojedinih genetičkih testova ovog istraživanja uspoređeni su s dijagnostičkim testovima različitih studija. Fisher's exact testom dobije se statistički značajna razlika u dijagnostičkom dosegu kod klasične kariotipizacije (P=0,008) i sekvenciranja egzoma (P=0,006) u usporedbi s literaturom. Dijagnostički doseg CMA uspoređen je s podacima iz literature na dva načina. Usporedbom pozitivnih nalaza CMA koje uključuju VUS-eve sa studijom Sansović i sur., dobije se statistički značajna razlika (P=0,014) (31). Također usporedbom pozitivnih nalaza koje isključuju VUS-eve s istom studijom, dobije se statistički značajna razlika (P=0,01). Statistički beznačajna razlika dobije se u usporedbi dijagnostičkih dosega ovog istraživanja i literature za FISH (P=0,799) i analizu *FMRI* gena (P=1).

U Tablici 12. prikazani su rezultati Fisher's exact testova usporedbe dijagnostički dosega različitih dijagnostičkih testova. Izvori dijagnostičkih dosega navedeni su u legendi tablice.

**Tablica 12.** Rezultati Fisher's exact testova usporedbe dijagnostičkih dosega genetičkih testova ovog istraživanja i podataka iz literature

Dijagnostički test	Dijagnostički doseg naše studije (%)	Dijagnostički doseg iz literature (%)	P*
Klasična kariotipizacija	9,7%	3% <sup>a</sup>	0,008
FISH	68,4%	64% <sup>b</sup>	0,799
CMA (uključujući VUS)	43,8%	31,2% <sup>c</sup>	0,014
CMA (isključujući VUS)	33,9%	21,7% <sup>c</sup>	0,01
ES	72,7%	31% <sup>d</sup>	0,006
Panel gena za epilepsiju	56,7%	48,5% <sup>e</sup>	0,616
Analiza <i>FMRI</i> gena	4,3%	3,5% <sup>f</sup>	1

\* Fisher's exact test

<sup>a</sup> Savatt i sur. (2)

<sup>b</sup> Mendez-Rosando i sur. (37)

<sup>c</sup> Sansović i sur. (31)

<sup>d</sup> Srivastava i sur. (38)

<sup>e</sup> Lemike i sur. (39)

<sup>f</sup> Hećimović i sur. (40)

U Tablici 13. prikazane su neke od fenotipskih karakteristika ispitanika podijeljenih po skupinama obzirom na rezultat kliničkog testiranja.

Većina (61,8%) ispitanika ima dismorfiju lica. Od razvojnih anomalija središnjeg živčanog sustava, najčešće su pronađene anomalije u području korpusa kalozuma (lat. *corpus callosum*). Među ispitanicima s drugim kongenitalnim anomalijama, najčešće su pronađene prirodene srčane greške te prirodene greške urogenitalnog sustava.

**Tablica 13.** Fenotipske karakteristike ispitanika

<b>Karakteristika fenotipa</b>	<b>Pozitivan nalaz (N=97)</b>	<b>Negativan nalaz (N=44)</b>	<b>Nalaz u izradi (N=66)</b>	<b>Ukupno (N=207)</b>
Dismorfija lica	65	25	38	128 (61,8%)
Razvojne anomalije SŽS-a	27	7	16	50 (24,2%)
Druge kongenitalne anomalije	50	22	24	96 (46,4%)

## **5. RASPRAVA**

U ovo istraživanje uključeno je 207 ispitanika s neurorazvojnim odstupanjima upućenih od strane neuropedijatra na genetičko testiranje. Isključeni su ispitanici sa sindromima Down, Patau, Edwards i Turner, ispitanici s izoliranim oštećenjima sluha i vida, te ispitanici s neuromuskularnim bolestima. Kod 97 ispitanika genetičkim testiranjem pronađene su promjene u genomu, od čega kod 75 (36,2%) ispitanika promjene koje potvrđuju genetičku etiologiju poremećaja, što je nešto više nego u dostupnoj literaturi (31%) (39).

Prema istraživanju Olusanya i sur., udio muškog spola kod djece s neurorazvojnim poremećajima iznosi 54%, što je gotovo jednako našem istraživanju (54,6%) (7). Raspon dobi pri dijagnozi pozitivnog genetičkog testa u našem istraživanju bio je od 1 mjeseca do 25 godina. Medijan dobi pri dobivanju pozitivnog nalaza iznosi 6 godina, što je približno jednako literaturi (7).

Dijagnostički doseg (engl. *diagnostic yield*) pokazuje kolika je vjerojatnost da će određeni test otkriti dijagnozu. Dijagnostički doseg pokazatelj je korisnosti testova u postavljanju dijagnoze. U ovom istraživanju, određen je dijagnostički doseg klasične kariotipizacije, FISH-a, CMA-a, sekvenciranja egzoma, panela gena za epilepsiju te analize *FMRI* gena.

Klasična kariotipizacija relativno je brz i jeftin test koji se još uvijek najčešće koristi kao ulazni test u kliničkom genetičkom ispitivanju. Prema literaturi, dijagnostički doseg klasične kariotipizacije iznosi oko 3%, dok je u ovom istraživanju 9,7%. Statistički značajna razlika ( $P=0,008$ ) dobivena Fisher's exact testom, može se objasniti time što ne postoje podaci iz literature isključivo za neurorazvojne poremećaje (2).

Fluorescentna in situ hibridizacija metoda je molekularne kariotipizacije koja se koristi najčešće za potvrdu dijagnoze dobivene klasičnom kariotipizacijom, ali i za dijagnostiku klinički prepoznatljivih sindroma. Dijagnostički doseg ovog istraživanja (68,4%) približno je jednak istraživanju Mendez-Rosado i sur. (64%) (37). Detaljan klinički pregled uz prepoznatljivi fenotip utječe na odabir podobnih kandidata za FISH, što je u konačnici bitan faktor za visoki dijagnostički doseg samog testa.

Dijagnostički doseg CMA uvelike ovisi o ubrajanju odnosno isključivanju varijanti nejasnog značenja (engl. *variant of uncertain significance*, VUS). Dijagnostički doseg ovog istraživanja u kojem su uključeni VUS-evi (43,8%) uspoređi se Fisher's exact testom s dijagnostičkim dosegom studije Sansović i sur. (31,2%) i dobije se statistički značajna razlika ( $P=0,014$ ). Potom se uspoređi dijagnostički doseg u koji su ubrojene samo patogene i vjerojatno patogene varijante (33,9%) s dosegom iste studije (21,7%), te se ponovno dobije statistički značajna razlika ( $P=0,01$ ) (31). Pregledom dostupne literature, pronađe se sustavni pregled Millera i sur. u kojem su analizirane studije dijagnostičkih dosega CMA u dijagnozi neurorazvojnih poremećaja. U sustavni pregled uključeni su dijagnostički dosezi u kojima su isključene varijante nepoznatog značenja. Raspon dosega iznosio je od 5,1% do 35% što su slični rezultati u usporedbi s dijagnostičkim dosegom ovog istraživanja (33,9%) (41).

Dijagnostički doseg sekvenciranja egzoma ovog istraživanja (72,7%), uspoređen Fischer's exact testom s meta-analizom dijagnostičkog dosega Srivastava i sur. pokazuje statistički značajnu razliku ( $P=0,006$ ) (38). Dobivena razlika uvelike ovisi o malom broju ( $N=11$ ) ispitanika ovog istraživanja, visokoj cijeni samog testa, te o donedavnoj nedostupnosti pokrivenosti testiranja zdravstvenim osiguranjem u Republici Hrvatskoj. Troškove testiranja sekvenciranjem egzoma ispitanika ove studije snosili su roditelji ispitanika.

Dostupni paneli gena za epilepsiju razlikuju se među proizvođačima po broju testiranih gena, od 35 do preko 300 gena koji su povezani s epilepsijom. U ovom istraživanju korišteni su paneli koji su uključivali 142 i 290 gena. Pregledom literature, pronađe se istraživanje Lemike i sur. koji su koristili panel gena s približno sličnim brojem gena (265 gena). Usporedbom dijagnostičkog dosega panela gena za epilepsiju ovog istraživanja (56,7%) i dijagnostičkog dosega studije Lemike i sur. (48,5%), Fisher's exact testom ne dobije se statistički značajna razlika (39).

Usporedbom dijagnostičkog dosega analize FMR1 gena ovog istraživanja s istraživanjem Hećimovića i sur. na populaciji polaznika specijalnih škola za intelektualno zaostalu djecu u Republici Hrvatskoj, Fisher's exact testom ne pronađe se statistički značajna razlika ( $P=1$ ) (40). Nizak dijagnostički doseg sekvenciranja FMR1 gena, prema Lubali i sur., može se povećati odabirom bolesnika koji odgovaraju fenotipu bolesnika s fragilnim X sindromom: velike prominentne uške, svijetlo plave oči, obiteljska anamneza intelektualnih odstupanja, spuštene stopala (42).



Pregledom literature, nisu pronađeni standardizirani protokoli za postavljanje genetičke dijagnoze neurorazvojnih poremećaja. Gotovo svi autori slažu se kako se prednost daje metodama poput CMA i sekvenciranja sljedeće generacije koji imaju daleko veće dijagnostičke dosege u dijagnosticiranju neurorazvojnih poremećaja od konvencionalnih metoda poput klasične kariotipizacije i sekvenciranja *FMRI* gena (2, 31, 36, 38, 39).

Varijante nejasnog značenja (engl. *variants of uncertain significance*, VUS) pronađene su kod 22 (22,7%) ispitanika, što odgovara podacima iz literature (2, 31, 38). Klasifikacija varijanti broja kopija te varijanti sekvence podložna je promjenama tijekom vremena. Rastući broj podataka u bazama poput DECIPHER-a i OMIM-a omogućava periodičnu reevaluaciju pojedinih varijanti, što često dovodi do reklasifikacije VUS-eva u benigne ili patogene. Jedno od istraživanja, ono Liu i sur. u kojem je provedena reevaluaciju rezultata sekvenciranja egzoma godinu dana nakon prvog pronalaska promjene u genomu, pokazalo je kako su 23 varijante nepoznatog značenja reklasificirane kao patogene (43).

Pronalazak genetske etiologije neurorazvojnih poremećaja bitan je kako u kliničkom, tako i u znanstvenom pogledu. Rastući broj genetski testiranih ispitanika, studija vezanih gena (engl. *linkage studies*) i asocijacijskih studija, omogućuje bolje razumijevanje patogeneze i neurobiologije neurorazvojnih poremećaja. U kliničkom smislu, pozitivan nalaz kliničkog genetičkog testiranja omogućava raniju intervenciju, bolje praćenje te eventualnu promjenu prethodne terapije. Prema Henderson i sur., kod 54,5% ispitanika došlo je do promjene u praćenju i terapiji nakon dobivenih pozitivnih nalaza CMA (44). Pozitivni rezultati panela gena za epilepsiju, također mogu dovesti do značajne promjene u terapiji i kontroli epileptičkih napadaja, primjerice kod ispitanika s mutacijom u genu *SCN1A*, preporuka je izbjegavati fenitoin i lamotrigin kao terapiju (20).

Rezultati genetičkog testiranja bitni su, kako za testiranog ispitanika, tako i za cijelu njegovu obitelj. Genetičko savjetovanje, nakon pozitivnih rezultata testa, obitelji ispitanika može pružiti uvid u prognozu neurorazvojnog poremećaja, mogućnosti praćenja i tretmana, te procjenu rizika za ponavljanje poremećaja, što je iznimno bitno za planiranje budućeg potomstva i moguću eventualnu prenatalnu dijagnostiku.

Unatoč što su dijagnostički dosezi genetičkih metoda testiranja ovog rada u skladu s dosadašnjim istraživanjima, on ima svoje nedostatke. Jedan od nedostataka svakako je teža dostupnost novijih, boljih dijagnostičkih testova, poput CMA te sekvenciranja sljedeće generacije. Određivanje genetičke etiologije neurorazvojnih poremećaja dugotrajan je proces, što je u perspektivi ove studije bitno jer su za gotovo trećinu ispitanika (31,8%) u trenutku prikupljanja podataka nalazi genetičkog testiranja bili u izradi.

Određivanje učestalosti pojedinih neurorazvojnih poremećaja bilo je otežano time što su neurorazvojni poremećaji vrlo heterogena skupina poremećaja, koja nema jasnu klasifikaciju. Dijagnostički i statistički priručnik za mentalne poremećaje, 5. izdanje (engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th edition, DSM-5*), Američke psihijatrijske udruge (engl. *American Psychiatric Association, APA*), ne prepoznaje poremećaje vida i sluha, cerebralnu paralizu i epilepsiju kao neurorazvojne poremećaje. Prema Ismail i sur., zbog rastućeg broja novih spoznaja u neurobiologiji i genetici, potrebna je reevaluacija dosadašnje klasifikacije koja bi objedinila kliničke karakteristike i patogenezu nastanka poremećaja (3).

## **6. ZAKLJUČCI**

Potvrđena je hipoteza ovog istraživanja.

1. U 97 (46,9%) ispitanika s neurorazvojnim poremećajima pronađena je promjena u genomu.
2. U 75 (36,2%) ispitanika, pronađena promjena u genomu potvrđuje gensku etiologiju neurorazvojnog poremećaja.
3. Ukupno 79 (38,2%) ispitanika imalo je kliničku dijagnozu više od jednog neurorazvojnog poremećaja, dok je 65 (31,4%) ispitanika bilo upućeno na genetičko testiranje zbog globalnog razvojnog zaostajanja.
4. Najviši dijagnostički doseg (engl. diagnostic yield) dobiven je testiranjem kromosomskim microarray-om i metodama sekvenciranja sljedeće generacije.
5. Većina ispitanika (61,8%) imala je dismorfiju lica, a gotovo polovica ispitanika (46,4%) imala je druge kongenitalne anomalije uz neurorazvojni poremećaj.

## **7. LITERATURA**

1. Thapar A, Cooper M, Rutter M. Neurodevelopmental disorders. *Lancet Psychiat.* 2017;4:339-46.
2. Savatt JM, Myers SM. Genetic testing in neurodevelopmental disorders. *Front Pediatr.* 2021;9:526779.
3. Ismail FY, Shapiro BK. What are neurodevelopmental disorders? *Curr Opin Neurol.* 2019;32:611-6.
4. Mejaški-Bošnjak V. Dijagnostički pristup ranom otkrivanju neurorazvojnih odstupanja. *Paediatr Croat.* 2007;51:105-10.
5. Kostovic I, Lukinovic N, Judas M, Bogdanovic N, Mrzljak I. Structural basis of the developmental plasticity in human cerebral cortex: The role of transient subplate zone. *Metab Brain Dis.* 1989;4:17-23.
6. Tomasović S, Predojević M. Neurorazvojni poremećaji i mogućnost njihovog prenatalnog probira. *Acta Med Croatica.* 2015;69:415-20.
7. Olusanya BO, Davis AC, Wertlieb D, Boo NY, Nair MKC, Breinbauer C i sur. Developmental disabilities among children younger than 5 years in 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet Glob Health.* 2018;6:1100-21.
8. Grubić M, Barišić N. Mentalna retardacija. U: Barišić N i sur. *Pedijatrijska neurologija.* 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 713-6.
9. Barišić N. Bolesti živčanog sustava i mišića. U: Mardešić D i sur. *Pedijatrija.* 8. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str. 951-1038.
10. Vasudevan P, Suri M. A clinical approach to developmental delay and intellectual disability. *Clin Med.* 2017;17:558-61.
11. Belanger SA, Caron J. Evaluation of the child with global developmental delay and intellectual disability. *Paediatr Child Health.* 2018;23:403-10.
12. Vidović V, Begovac I, Majić G, Škrinjaric J, Grubić M, Barišić N. Dječja psihijatrija. U: Barišić N i sur. *Pedijatrijska neurologija.* 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 717-58.
13. McPartland J, Volkmar FR. Autism and related disorders. *Handb Clin Neurol.* 2012;106:407-18.
14. Rylaarsdam L, Guemez-Gamboa A. Genetic causes and modifiers of autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:385.
15. Posner J, Polanczyk GV, Sonuga-Barke E. Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet.* 2020;395:450-62.

16. Barišić N. Cerebralna paraliza. U: Barišić N i sur. Pedijatrijska neurologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 195-203.
17. Barišić N. Cerebralni napadaji i epilepsije/epileptički sindromi. U: Barišić N i sur. Pedijatrijska neurologija. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2009. str. 204-94.
18. Camfield P, Camfield C. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. *Epileptic Disord.* 2015;17:117-23.
19. Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia.* 2011;52:1052-7.
20. Wang J, Lin ZJ, Liu L, Xu HQ, Shi YW, Yi YH i sur. Epilepsy-associated genes. *Seizure.* 2017;44:11-20.
21. Blažeković A, Gotovac K, Borovečki F. Dijagnostika epilepsija upotrebom sekvenciranja sljedeće generacije. *Paediatr Croat.* 2016;60:72-8.
22. Turnpenny PD, Ellard S. The cellular and molecular basis of inheritance. U: Turnpenny PD, Ellard S i sur. *Emery's Elements of medical genetics.* 15. izdanje. New York: Elsevier; 2017. str. 9-21.
23. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG i sur. The sequence of the human genome. *Science.* 2001;291:1304-51.
24. Yan C, Duanmu X, Zeng L, Liu B, Song Z. Mitochondrial DNA: Distribution, mutations and elimination. *Cells.* 2019;8:379.
25. Fridovich I, Robinson A, Fridovich-Keil JL. Human genetic disease [Internet]. Chicago: Encyclopaedia Britannica; 2020 [citirano 23. srpnja 2021.]. Dostupno na: <http://www.britannica.com/science/human-genetic-disease/>
26. Mardešić D, Begović D, Huljev Frković S. Nasljedne i prenatalno stečene bolesti. U: Mardešić D i sur. *Pedijatrija.* 8. izdanje. Zagreb: Školska knjiga; 2016. str.75-125.
27. Tucci V, Isles AR, Kelsey G, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting and physiological processes in mammals. *Cell.* 2019;179:952-65.
28. Levy B, Wapner R. Prenatal diagnosis by chromosomal microarray analysis. *Fertil Steril.* 2018;109:201-12.
29. Kwonk PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol.* 2003;5:42-60.
30. Sansović I, Ivankov AM, Bobinec A, Barišić I. Kromosomski microarray u kliničkoj dijagnostici osoba s razvojnim poremećajima. *Paediatr Croat.* 2016;60:58-64.
31. Sansovic I, Ivankov AM, Bobinec A, Kero M, Barisic I. Chromosomal microarray in clinical diagnosis: a study od 337 patients with congenital anomalies and developmental delays or intellectual disability. *Croat Med J.* 2017;58:231-8.

32. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A i sur. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendations of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med.* 2020;22:245-57.
33. Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing?. *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013;98:236-8.
34. Wang W, Corominas R, Lin GN. De novo mutations from whole exome sequencing in neurodevelopmental and psychiatric disorders: from discovery to application. *Front Genet.* 2019;10:258.
35. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J i sur. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17:405-23.
36. Poduri A. When should genetic testing be performed in epilepsy patients?. *Epilepsy Currents.* 2017;17:16-22.
37. Mendez-Rosado LA, Garcia D, Molina-Gamboa O, Garcia A, De Leon N, Lantigua-Cruz A i sur. Algorithm for the diagnosis of patients with neurodevelopmental disorders and suspicion of a genetic syndrome. *Arch Argentr Pediatr.* 2020;118:47-60.
38. Srivastava S, Love-Nichols JA, Dies KA, Ledbetter DH, Martin CL, Chung, WK i sur. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med.* 2019;21:2413-21.
39. Lemke JR, Riesch E, Scheurenbrand T, Schubach M, Wilhelm C, Steiner I i sur. Targeted next generation sequencing as a diagnostic tool in epileptic disorders. *Epilepsia.* 2012;53:1387-98.
40. Hecimovic S, Tarnik IP, Baric I, Cakarun Z, Pavelic K. Screening for fragile X syndrome: results from a school for mentally retarded children. *Acta Paediatr.* 2002;91:535-9.
41. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP i sur. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J Hum Genet.* 2010;86:749-64.



42. Lubala TK, Lumaka A, Kanteng G, Mutesa I, Mukuku O, Wembonyama S i sur. Fragile X checklist: a meta-analysis and development of a simplified universal clinical checklist. *Mol Genet Genom Med*. 2018;6:526-32.
43. Liu P, Meng L, Normand EA, Xia F, Song X, Ghazi A i sur. Reanalysis of clinical exome sequencing data. *New Engl J Med*. 2019;380:2478-80.
44. Henderson LB, Applegate CD, Wohler E, Sheridan MB, Hoover-Fong J, Batista DAS. The impact of chromosomal microarray on clinical managment: a retrospective analysis. *Genet Med*. 2014;16:657-64.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** Cilj istraživanja bio je utvrditi dijagnostički doseg pojedinih metoda genetskog testiranja u dijagnozi neurorazvojnih poremećaja.

**Ispitanici i metode:** Provedeno je retrospektivno presječno istraživanje za razdoblje od 1.siječnja 2016. do 31. prosinca 2019. godine. Pregledana je arhivirana medicinska dokumentacija 207 ispitanika s neurorazvojnim poremećajim upućenih na genetsko testiranje pri Citogenetskom laboratoriju KBC-a Split i Ambulanti za medicinsku genetiku. Pronađeno je 97 ispitanika kojima je klasičnom kariotipizacijom, fluorescentnom *in situ* hibridizacijom (FISH), kromosomskim microarray-om (engl. *chromosomal microarray analysis*, CMA) ili metodama sekvenciranjem sljedeće generacije pronađena promjena u genomu. Prikazani su podatci o dobi, spolu, fenotipu, genotipu te klasifikaciji neurorazvojnog poremećaja.

**Rezultati:** U 97 (46,9%) ispitanika s neurorazvojnim poremećajem genetičkim testiranjem pronađena je promjena u genomu, od čega kod 75 (36,2%) promjena značajna za ispitanikov fenotip. Najčešće su na genetičko testiranje, od strane neuropedijatra, bili upućivani ispitanici s višestrukim neurorazvojnim poremećajima, te globalnim razvojnim zaostajanjem. Najviši dijagnostički dosezi postignuti su CMA-om te sekvenciranjem sljedeće generacije. Većina ispitanika imala je dismorfiju lica, a gotovo polovica ispitanika (46,4%) imala je druge kongenitalne anomalije uz neurorazvojni poremećaj.

**Zaključci:** Novije metode genetičkog testiranja, poput CMA i metoda sekvenciranja sljedeće generacije, trebale bi biti prvi izbor pri postavljanju genetičke etiologije neurorazvojnih poremećaja. Dijagnostički dosezi klasične kariotipizacije, FISH-a i analize FMR1 gena, mogu se povećati boljim prepoznavanjem klinički prepoznatljivih obrazaca ispitanika kod kojih postoji sumnja na određeni sindrom.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Results of the clinical genetic testing in children with neurodevelopmental delays in University Hospital of Split from 2016-2019

**Objectives:** The aim of the study was to determine the diagnostic yield of the tests used in finding the genetic etiology of neurodevelopmental disorders.

**Patients and methods:** A retrospective cross-sectional study was conducted from January 1st 2016 to December 31st 2019. Archived medical documentation of 207 subjects from the Cytogenetic Laboratory at the University Hospital of Split was examined. 97 subjects have had genome variation found by classical cytogenetics, fluorescent in situ hybridisation (FISH), chromosomal microarray analysis (CMA) or next-generation sequencing (NGS). Data on age, sex, phenotype, genotype and type of neurodevelopmental disorder was presented.

**Results:** 97 (46.9%) subjects have had genome variation found, of which 75 (36.2%) have had genetic etiology of their neurodevelopmental disorders confirmed. Most subjects were referred by pediatric neurologists with the diagnosis of multiple neurodevelopmental disorders and global developmental delay. The highest diagnostic yields were achieved by CMA and next-generation sequencing tests. Most of the subjects had facial dysmorphism and almost half of them had other congenital anomalies.

**Conclusion:** Newer methods for genetic testing, such as CMA and next-generation sequencing, should be first-tier diagnostic tests for determination of the genetic etiology of neurodevelopmental disorders, due to their high diagnostic yields. Diagnostic yields of classical cytogenetics, FISH and FMR1 gene analysis, could be increased by better recognition of clinically recognizable patterns in subjects suspicious of the certain syndrome.

## **10. ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: Veronika Pupić-Vurilj

Datum rođenja: 5. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Sinj, Republika Hrvatska

Državljanstvo: Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Put Strinje 20A, Kaštel Sućurac

## **OBRAZOVANJE**

2001. – 2003. Osnovna škola fra Pavla Vučkovića, Sinj – Turjaci

2003. – 2009. Osnovna škola Majstora Radovana, Trogir

2009. – 2013. Srednja škola Ivana Lucića – opća gimnazija, Trogir

2013. – 2022. Medicinski fakultet, Sveučilište u Splitu, studij medicine

## **VJEŠTINE**

Aktivno korištenje engleskog te razumijevanje talijanskog jezika

Informatička pismenost