

58. srečanje mladih raziskovalcev Slovenije 2024

GENOMSKA ANALIZA PRI MLADIH ŠPORTNIKIH ZA RAZLIKOVANJE ŠPORTNEGA SRCA IN ZGODNJIH OBLIK KARDIOMIOPATIJ

Raziskovalna naloga

Raziskovalno področje: ZDRAVSTVO



Avtor: Eva Grbič

Mentor: Helena Bajec, prof.

Somentor: doc. dr. Špela Stangler Herodež, univ. dipl. ing. kem. tehn.

Maribor, april 2024

Kazalo vsebine

Povzetek	IV
Okrajšave in simboli	V
Zahvala	VI
1 Uvod	1
2 Hipoteze naloge.....	3
3 Teoretično ozadje	4
3.1 Nenadna srčna smrt mladih športnikov	4
3.2 Vzroki za nenadno srčno smrt (SCD)	5
3.3 Športno srce	6
3.3.1 Strukturne prilagoditve.....	7
3.3.2 Funkcijske prilagoditve	7
3.3.3 Električne prilagoditve	7
3.4 Kardiomiopatije	8
3.4.1 Hipertrofična kardiomiopatija	8
3.4.2 Aritmogena kardiomiopatija.....	9
3.4.3 Dilatativna kardiomiopatija	10
3.5 Razlikovanje športnega srca in kardiomiopatije.....	11
3.6 Metoda sekvenciranja po Sangerju	12
3.7 Metoda sekvenciranja nove generacije	13
4 Metode.....	14
4.1 Vzorci.....	14
4.2 Potek dela	14
4.3 Ročna izolacija DNA iz levkocitov	15
4.3.1 Kemikalije	15
4.3.2 Laboratorijska oprema	16
4.3.3 Protokol dela.....	16

4.4	Sekvenciranje nove generacije (NGS)	21
4.5	Sekvenciranje po Sangerju in sekvenciranje na SeqStudios	22
4.5.1	Kemikalije	22
4.5.2	Laboratorijska oprema	23
4.5.3	Protokol dela.....	24
4.6	Analiza podatkov z bioinformatškima orodjema VarSome in Franklin	28
5	Rezultati.....	29
5.1	Predstavitev primera	32
6	Diskusija	33
7	Družbena odgovornost.....	36
8	Zaključek in sklepi	37
9	Viri in literatura.....	38
	Priloge	40

Kazalo tabel

Tabela 1: Koncentracija PCR produkta [ng/ μ l] glede na količino PCR produkta [μ l]	26
Tabela 2: Vsi rezultati NGS sekvenciranja, analize z bioinformatičkima orodjema in podatki o športnikih.....	42

Kazalo slik

Slika 1: Potek celotne metodologije dela	15
Slika 2: Začetni vzorec krvi.....	16
Slika 3: Vzorec po mešanju.....	17
Slika 4: Centrifugiranje vzorca.....	17
Slika 5: Inkubacija vzorcev v vodni kopeli	18
Slika 6: Nitke DNA v vzorcu	18
Slika 7: Meduza v Pasteurjevi pipeti.....	19
Slika 8: Meduza v epruvetki.....	19
Slika 9: Meduza na dnu epruvetke.....	19
Slika 10: Sušenje DNA v liofilizatorju	20
Slika 11: DNA po sušenju	20
Slika 12: Vzorci in začetne kemikalije.....	24
Slika 13: Priprava gela za elektroforezo	25
Slika 14: Fragmenti pomnožene DNA na ekranu	25
Slika 15: Aparat QIAcube in reagenti.....	26
Slika 16: Prikaz segregacije genoma na mestu ugotovljene različice pri deklici (V2A) in očetu (004938)	40
Slika 17: Prikaz segregacije genoma na mestu ugotovljene različice pri mami (004752) in bratu (V1V)	41

Kazalo grafov

Graf 1: Vzroki nenadne srčne smrti športnikov >30 let v Sloveniji (Starc idr., 2005).....	6
Graf 2: Ugotovljena odstopanja na sistematskem pregledu športnikov pri laboratorijskih izvidih in EKG.....	29
Graf 3: Rezultati sekvenciranja NGS	30
Graf 4: Rezultati klasifikacije različic z bioinformatičkim orodjem Franklin.....	31
Graf 5: Rezultati klasifikacije različic z bioinformatičkim orodjem VarSome	31

POVZETEK

Telesna dejavnost je sestavni del življenja vsakega posameznika. Ob rednem treniranju napornih in vzdržljivostnih športov lahko na srcu nastanejo funkcijske in strukturne prilagoditve, t. i. športno srce. Tako prilagojeno srce na testiranjih pogosto pokaže podobne rezultate kot srce s patološkimi spremembami pri zgodnjih oblikah kardiomiopatij. Tovrstne bolezni je zaradi nemega poteka treba aktivno iskati. Metoda, ki omogoča hitro učinkovito sekvenciranje genoma, je sekvenciranje nove generacije (NGS). V raziskavi nas je zanimalo, ali lahko NGS uporabimo za ugotavljanje potencialno patogenih različic genoma, s pomočjo katerih lažje razlikujemo športno srce od sprememb srca, značilnih za kardiomiopatijo. Ugotovili smo, da je NGS primerno za tovrstno testiranje, vse različice smo uspešno potrdili z metodo sekvenciranja po Sangerju. Z raziskavo smo potrdili tudi predpostavko, da lahko z bioinformatičkima orodjema VarSome in Franklin uspešno klasificiramo različice pridobljene z NGS.

Ključne besede: nenadna srčna smrt mladih športnikov, kardiomiopatije, športno srce, NGS, sekvenciranje po Sangerju, bioinformatična orodja

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ARMC - American College of Medical Genetics and Genomics

ARCM – aritmogena kardiomiopatija

DCM – dilatativna kardiomiopatija

DNA- deoksiribonukleinska kislina

EKG – elektrokardiogram

HCM – hipertrofična kardiomiopatija

LP – levi prekat

MR – magnetna resonanca

MYBPC3 – gen za miozinski vezalni protein

MYH7 – gen za težko verigo beta miozina

NGS – sekvenciranje nove generacije

SCD – nenadna srčna smrt

TNNT2 – gen za troponin 2

UKC Maribor – Univerzitetni klinični center Maribor

VOUS – Variant of unknown significance

ZAHVALA

Iz srca se zahvaljujem zunanji mentorici za spremljanje laboratorijskega dela in pomoč pri analizi podatkov.

Iskreno bi se rada zahvalila tudi šolski mentorici za vso pomoč pri nastajanju raziskovalne naloge.

Posebne zahvale grede tudi Kliničnemu inštitutu za genetsko diagnostiko UKC Maribor, ki mi je omogočil uporabo laboratorijske opreme, aparatov in kemikalij za raziskovanje.

Zahvaljujem se tudi kopirnici šole, ki jo obiskujem, za dodatno pomoč pri oblikovanju naloge.

1 UVOD

Nenadna srčna smrt mladih športnikov, ki naj bi predstavljali »sinonim zdravega načina življenja«, je dogodek, ki ne prizadene le družine pokojnega, temveč tudi širšo javnost. Znaki, ki lahko kažejo na srčna obolenja, so predvsem izguba zavesti, omotica ali vrtoglavica (posebno, če se pojavi med telesnim naporom), pojav prsne bolečine med telesnim naporom, težko dihanje ali utrujenost, ki nista sorazmerna s stopnjo telesne obremenitve in občutek nepravilnega bitja srca. (Ažman-Juvan, 2014a)

Če srčna obolenja, ki povečajo tveganje za nenadno srčno smrt, pravočasno odkrijemo, jih lahko zdravimo, športnikom svetujemo glede nadaljevanja s športno aktivnostjo in preprečimo večino nenadnih srčnih smrti, prav tako pa tudi upočasnimo napredovanje nekaterih obolenj. (Ažman-Juvan, 2014a)

Vendar se opozorilni znaki pri mladih, ki so umrli nenadne srčne smrti, po različnih raziskavah pojavljajo le v 2 do 20%, kar pomeni, da moramo srčna obolenja aktivno iskati. Temu so namenjeni preventivni pregledi športnikov, vendar pa samo usmerjeni pogovor (anamneza) in telesni pregled športnika navadno ne zadostujeta. (Ažman-Juvan, 2014a)

Ključnega pomena za prognozo bolezni, terapijo in uspešni izid zdravljenja je razumevanje bolezni in določanje genetske komponente. Do sedaj je bilo možno določanje posameznih genetskih markerjev, kar pa je bilo zelo zamudno, drago in neuporabno v klinične namene. Z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS) in uporabo kita TruSight Cardio Sequencing Kit, ki pokriva 174 genov, ki igrajo ključno vlogo pri nenadni srčni smrti, je možno premostiti te probleme. Metoda omogoča analizo vseh genov simultano v enem poskusu, kar je ne glede na začetni visok strošek, veliko ceneje in hitreje kot klasično sekvenciranje posamičnih genov po Sangerju. Hitrost analize možnih kandidatnih genov je ključna za hitro in natančno klinično intervencijo, ki omogoča pri obravnavi športnega srca pravilno razlikovanje med fiziološkimi prilagoditvami in srčno-žilnimi boleznimi. S tem se izognemo nepotrebnim diskvalifikacijam športnikov zaradi napačne postavitve diagnoze srčno-žilne bolezni, obenem pa ne zamenjamo začetnih patoloških sprememb za fiziološke, kar bi bilo za športnika lahko usodno z nadaljevanjem tekmovalnega športa.

Cilj raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali je metoda NGS primerna in učinkovita za razlikovanje med patološkimi spremembami srca, značilnih za kardiomiopatije, in strukturnimi ter fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce). Zanimalo nas je, ali lahko s sekvenciranjem po Sangerju potrdimo genetske spremembe, ugotovljene z metodo NGS. Raziskovali smo tudi, ali je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za določanje segregacije znane družinske mutacije, in ali sta bioinformatična orodja VarSome in Franklin med seboj primerljiva in učinkovita za ustrezno klasifikacijo genetskih sprememb.

V raziskavi *Screening of sarcome gene mutations in young athletes with abnormal findings in electrocardiography* so prvič uporabili genetsko testiranje za razlikovanje hipertrofične kardiomiopatije od športnikovega srca pri 102 japonskih športnikih, ki so kazali značilnosti hipertrofije na EKG ali na radiografiji prsnega koša. Genetski test, izveden s sekvenciranjem štirih sarkomernih genov, je bil pozitiven v 4,6% primerov. Genetske analize, čeprav so maloštevilne, torej kažejo, da je treba pravilno izbrati športnike, primerne za genetsko testiranje na podlagi odstopanj na pregledih. (Barretta idr., 2020)

2 HIPOTEZE NALOGE

H1: Zaradi celovite genske pokritosti in večje občutljivosti predpostavljamo, da lahko z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS) pri posamezniku ugotovimo genetske spremembe, ki omogočajo učinkovito razlikovanje med patološkimi spremembami srca, značilnimi za kardiomiopatije, in strukturnimi ter fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce).

H2: Ker oba bioinformatična orodja Franklin in Varsome omogočata klasifikacijo posamezne različice glede na kriterij razvrščanja po patogenosti oz. benignosti skladno s priporočili priročnika American College of Medical Genetics (ACMG) Standards and guidelines (Richards in sod., 2015), pričakujemo, da bosta obe orodji med seboj primerljivi in učinkoviti za ustrezno klasifikacijo genetskih sprememb, ki omogočajo učinkovito razlikovanje med patološkimi spremembami na srcu (srčno-žilne bolezni, zlasti kardiomiopatije, ki lahko povečajo tveganje za nenadno srčno smrt) in strukturnimi in fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce), ugotovljenih z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS).

H3: Ker je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda sekvenciranja kratkih fragmentov DNA z nizko stopnjo napak, predvidevamo, da je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za potrditev genetskih sprememb, že ugotovljenih z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS).

H4: Pričakujemo, da je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za določanje segregacije znane družinske mutacije, ker omogoča natančno določitev zaporedja majhnih fragmentov DNA – tistih, kjer je bila z NGS ugotovljena mutacija.

3 TEORETIČNO OZADJE

3.1 Nenadna srčna smrt mladih športnikov

Nenadna srčna smrt (angl. sudden cardiac death, SCD) je po definiciji Evropskega kardiološkega združenja nepričakovana in nenadna smrt, ki se najpogosteje pojavi pri asimptomatskih in navidezno zdravih osebah ali osebah z že znano srčno boleznijo v časovnem razponu ene ure od začetka težav oz. pojava prvega od simptomov. (Starc, Marušič in Starc, 2005)

Nenadni srčni zastoj je nenadno prenehanje delovanja srca, ki v primeru neustreznega ukrepanja vodi v nenadno srčno smrt, ki se pojavi v obliki maligne motnje srčnega ritma. Navadno bolnik nima predhodnih simptomov ali opozorilnih znakov. Če pa se pojavijo, so nespecifični, kot so bolečina in neugoden občutek v prsnem košu, hiter srčni utrip, neprijetni občutki ob hitrem ali močnem utripanju srca (palpitacije), težko dihanje, omedlevica ali občutek omotice, kratka sapa in slabost. Bolnik je neodziven, ne diha in ne kaže znakov delovanja krvnega obtoka, kar povzroči nenadno izgubo zavesti in kolaps. Pogosto nenadni srčni zastoj laiki zamenjajo z epileptičnim napadom, saj se lahko v prvih minutah pojavijo krči. (Accetto idr., 2018; Barretta idr., 2020)

Študije prejšnjega stoletja so pokazale povezavo nagnjenosti k SCD zaradi genetskih predispozicij. Znano je tudi, da se lahko SCD pojavi zaradi eksogenega sprožilnega dejavnika, ki povzroči električne ali strukturne motnje. (Barretta idr., 2020)

Eksogeni sprožilci so lahko povišana telesna temperatura, uživanje alkohola, elektrolitske motnje (pomanjkanje kalija, magnezija), hipertenzivna kriza, okužba, kajenje in nosečnost. Eden izmed pomembnih sprožilcev, ki v javnosti vzbuja dvom, je tudi dolgotrajna in intenzivna telesna vadba. SCD je tako najpogosteje posledica prekatne fibrilacije, ki jo povzroči naval adrenalina, k njej pa pripomorejo še izsušenost, pregretje, elektrolitsko neravnovesje in povečano zlepljanje krvnih ploščic (trombocitov). Po eni strani redno ukvarjanje s športom zmanjšuje celokupnost umrljivost in ima številne pozitivne učinke na zdravje in počutje, po drugi strani pa lahko začasno poveča tveganje za SCD, v primeru nagnjenosti k nevarnim kardiovaskularnim stanjem. (Ažman-Juvan, 2014; Ažman-Juvan idr., 2014; Barretta idr., 2020)

O tovrstni smrti priča že starogrški mit iz leta 490 pr. n. št. o vojaku Fejdipidu, ki se je po pretečeni 42 kilometrov dolgi poti od Maratonskega polja do Aten po oznanitvi zmage grške vojske proti Perzijcem mrtev sesedel. (Ažman-Juvan, 2014)

SCD predstavlja 15% vse umrljivosti v razvitem svetu in 80% vseh nenadnih smrti športnikov, ki niso povezane s poškodbo. Kljub redkosti so v javnosti odmevne in pronicljive in v družbo zasadijo neutemeljen dvom o koristnosti telesne vadbe, saj naj bi mladi športniki predstavljali najbolj zdrav del populacije. (Accetto idr., 2018; Šinkovec idr., 2018)

Na splošno velja, da se prevalenca SCD povečuje s starostjo športnikov, pri mladih pa do SCD najpogosteje prihaja med 17,1 in 23 leti starosti. Pogostnost SCD se povečuje tudi z intenzivnostjo ukvarjanja s športom; 3-9-krat je večja pri moških kot pri ženskah. Tveganje je pri zlasti mladih tekmovalnih športnikih, ki imajo srčno-žilne bolezni ali genetska nagnjenja, 2-3-krat večje kot pri njihovih športno nedejavnih vrstnikih, pogostnost srčno-žilnih bolezni povezanih s SCD pri navidezno zdravih mladih športnikih pa je ocenjena na 0,3%. (Ažman-Juvan, Jug, Jan, Prokšelj, 2020)

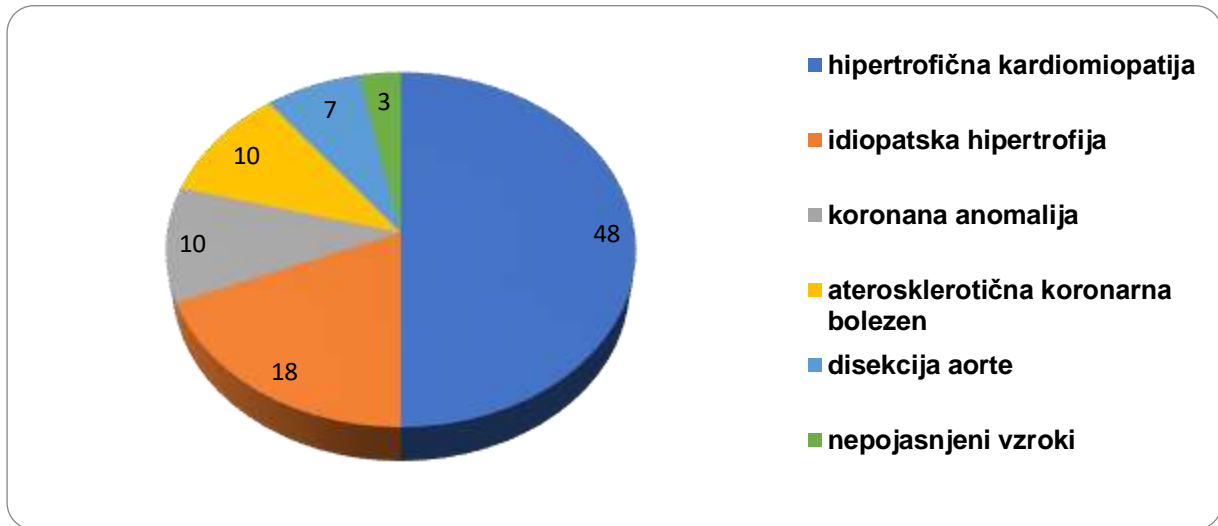
3.2 Vzroki za nenadno srčno smrt (SCD)

SCD je najpogostejši vzrok nenadne smrti športnikov vseh starosti. Vzroki za SCD pa se pri posameznih starostnih skupinah razlikujejo. Najpogostejši vzrok starejših športnikov (>35 let) je v več kot 85% aterosklerotična bolezen žil, ki prehranjujejo srce (koronarne arterije). (Ažman-Juvan, 2014)

Pri mlajših športnikih (<35 let) pa je SCD v večini primerov posledica prirojenih/podedovanih in pridobljenih srčnih bolezni, za katere večinoma ne vedo, da jih imajo, saj pogosto potekajo klinično nemo. Najpogostejši vzroki so hipertrofična kardiomiopatija, prirojeno nepravilna izstopišča koronarnih arterij iz aorte, prezgodnja ateroskleroza koronarnih arterij in aritmogena kardiomiopatija desnega prekata. (Ažman-Juvan, 2014; Ažman-Juvan in Zupet, 2010)

Podedovane oz. genetske kardiomiopatije so najpogostejši vzrok za SCD mladih športnikov. Raziskave v ZDA so pokazale, da je v več kot tretjini primerov vodilni vzrok hipertrofična kardiomiopatija. Na drugi strani pa je v Italiji pri skoraj četrtini primerov vzrok za SCD aritmogena kardiomiopatija desnega prekata. Tam imajo namreč že več kot 25 let uzakonjeno preventivno pregledovanje vseh športnikov, kjer potencialne srčne bolnike pravočasno

diskvalificirajo in tako iz tekmovalnega športa izločijo večino športnikov s hipertrofično kardiomiopatijo. (Ažman-Juvan, 2014; Ažman-Juvan in Zupet, 2010)



Graf 1: Vzroki nenadne srčne smrti športnikov >30 let v Sloveniji (Starc idr., 2005)

Drugi vzroki za SCD so še: (Ažman-Juvan, 2014)

- vnetje srčne mišice (miokarditis), ki ga sproži virusno obolenje dihal,
- bolezni z okvarjenimi kanalčki za prehod ionov preko membrane srčno-mišičnih celic (sindrom dolge in kratke dobe QT, sindrom Brugada),
- nekatere napake srčnih zaklopk,
- sindrom Wolf-Parkinson-White, ...

SCD lahko povzroči tudi uživanje prepovedanih snovi in poživil (anabolni steroidi, efedrin, kokain, pseudoefedrin ...). (Ažman-Juvan, 2014)

3.3 Športno srce

Športno srce je srce, ki je zaradi dolgotrajne redne intenzivne telesne vadbe razvilo določene fiziološke strukturne, funkcijske in električne prilagoditve. (Accetto idr., 2018)

Prilagoditve omogočajo zadovoljitev povečanih potreb po kisiku in hranilih med intenzivnejšimi napori. Nastanejo kot posledica hipertrofiranja v času intenzivnega napora, kar

povzroči krepitev srca kot mišice, športniku pa s tem omogoči intenzivnejšo aktivnost. (Ažman-Juvan idr., 2020)

3.3.1 Strukturne prilagoditve

Strukturne prilagoditve se razlikujejo glede na vrsto obremenitve. Obsegajo simetrično povečanje vseh srčnih votlin in zadebelitev sten levega prekata (LP) – hipertrofijo. Razširita se lahko glavni žili, po katerih izteka kri iz srca (aorta in pulmonalna arterija). (Ažman-Juvan idr., 2020)

Pri dinamični (npr. tek) gre zlasti za ekscentrično hipertrofijo LP, kjer se poveča votlina prekata z manj izrazito zadebelitvijo sten LP. (Accetto idr., 2018)

Pri aktivnostih, ki so pretežno statične (npr. dvigovanje uteži), pride do koncentrične hipertrofije LP. To pomeni, da se zadebelijo stene LP, ne da bi se povečala votlina. (Accetto idr., 2018)

Kombinirana hipertrofija LP pa se pojavi pri športih, kjer so prisotne tako dinamične kot statične obremenitve (npr. kolesarjenje, veslanje). (Accetto idr., 2018)

3.3.2 Funkcijske prilagoditve

Za športno srce je značilen tudi večji utripni volumen in njegova rezerva (zmožnost, da se med naporom poveča krčljivost), ki ga povzroči bradikardija. Bradikardija pomeni počasnejši srčni utrip v mirovanju zaradi povišanega tonusa parasimpatičnega živčevja in povzroči boljše polnjenje srca. (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan idr., 2020)

3.3.3 Električne prilagoditve

Električne prilagoditve zaznamo z elektrokardiogramom v mirovanju. Mednje prištevamo posledice povečanega tonusa parasimpatičnega živčevja in povečanje srčnih votlin. Vse električne spremembe ob začetku obremenitve praviloma izginejo. (Ažman-Juvan idr., 2020)

3.4 Kardiomiopatije

Kardiomiopatije predstavljajo glavni vzrok SCD mladih športnikov, v splošni populaciji pa delež razširjenosti znaša 3%. Uvrščamo jih med monogenske bolezni, ki v splošnem povzročajo variacije enega gena, prisotne so od rojstva, tveganje pa lahko predvidevamo na podlagi družinskega vzorca s pomočjo ugotavljanja segregacije znane družinske mutacije. (Barretta idr., 2020)

Kardiomiopatije so redke bolezni, v ožjem pomenu besede pa primarne bolezni srčne mišice, ki so povezane s spremenjenim delovanjem srca. Niso posledica bolezenskih sprememb drugih srčnih struktur. (Accetto idr., 2018)

3.4.1 Hipertrofična kardiomiopatija

Hipertrofična kardiomiopatija (angl. hypertrophic cardiomyopathy, HCM) je najpogostejši vzrok SCD mladih športnikov med telesno aktivnostjo in najpogostejša med kardiomiopatijami. (Ažman-Juvan idr., 2020)

V splošni populaciji znaša prevalenca 0,2%, kar pomeni, da povprečno prizadene 1 na 500 odraslih. (Duncan, 2016)

Zanjo je značilna bolezenska zadebelitev srčne mišice. Gre za asimetrično hipertrofijo prekatov (zlasti levega, lahko tudi desnega), brez jasnega zunanega vzroka. (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan idr., 2020)

Če so v zdravem srcu mišična vlakna urejena in debelina srčnih sten normalna, se pri HCM stene asimetrično zadebelijo in urejenost vlaken se poruši. Zato se lahko poveča tveganje za nastanek življenjsko nevarnih motenj ritma (prekatna tahikardija/prekatna fibrilacija) in zmanjša učinkovitost srca. Vzroki manj učinkovitega delovanja srca so lahko blokada pretoka krvi v srcu zaradi nenormalne zadebelitve srčne mišice (obstruktivna HCM) ali togost miokarda (neobstruktivna HCM). (Ažman-Juvan idr., 2020)

HCM je genetsko heterogena bolezen, ki se v 60% deduje avtosomno dominantno. V večini primerov je posledica mutacije enega izmed mnogih genov, ki kodirajo proteine srčnomišične sarkoleme. Redkeje gre za patogene različice genov za proteine celičnega kalcijevega transporta. (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan idr., 2014; Šinkovec idr., 2018)

Najpogostejše so mutacije genov za težke verige beta miozina (*MYH7*), miozinski vezalni protein (*MYBPC3*) in troponin T (*TNNT2*). (Šinkovec idr., 2018)

Simptomi se razlikujejo od posameznika do posameznika, tudi začnejo se lahko v različnih starostnih obdobjih. Najpogosteje se pojavijo med naporom, vendar večina bolnikov pred smrtjo nima težav. Simptomi, ki nakazujejo na HCM so lahko omotica, sinkopa (omedlevica), palpitacije, prsna bolečina in izrazitejša težka sapa, ki ne ustrežata stopnji telesne obremenitve. V primeru potrjene HCM je ukvarjanje s tekmovalnim športom dovoljeno le športnikom, ki imajo nizka tveganja in se ukvarjajo s športom, ki povzroča majhne dinamične in statične obremenitve. (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan idr., 2014)

3.4.2 Aritmogena kardiomiopatija

Aritmogena kardiomiopatija desnega prekata (angl. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy, ARVC) je dedna bolezen medceličnih stikov (dezmosomov), ki se pojavi predvsem na desnem prekatu. Značilno je napredujoče srčno popuščanje, nenadna smrt in prekatne aritmije. (Ažman-Juvan idr., 2020; Šinkovec idr., 2018)

Po uvedbi sistematičnega preventivnega pregledovanja športnikov v Italiji, kjer izločijo večino obolelih za HCM, predstavlja najpogostejši vzrok SCD mladih tekmovalnih športnikov, načeloma pa enega izmed pogostejših vzrokov smrti športnikov pod 35 let. Je genetsko heterogena bolezen, ki se načeloma deduje avtosomno dominantno, lahko pa tudi avtosomno recesivno. Pri moških in ženskah se pojavlja enako pogosto, z razliko da imajo moški običajno težji potek bolezni. V 30-50% se pojavlja družinsko, potek bolezni pa zelo variira. (Ažman-Juvan idr., 2014)

Nastane, ko se srčno-mišične celice nadomeščajo z maščobnim in vezivnim tkivom. Pojavijo se otočki tkiva, ki niso sposobni normalno prevajati električnih signalov in se normalno krčiti. Zaradi tega pride do električne nestabilnosti, kar povzroči motnje ritma. Simptomi so palpitacije, omotice, sinkopa, pri 20% mladih pa je prvi znak bolezni SCD. Bolezen ne poteka kronično progresivno, temveč ima obdobja napredovanja in stagniranja. Z napredovanjem bolezni se lahko pojavijo znaki desnostranskega srčnega popuščanja, kar pomeni zadihanost, slabo telesno zmogljivost in otekanje nog ter trebuha. Športnikom s potrjeno ARVC ni dovoljeno ukvarjanje z nobeno vrsto tekmovalnega športa. (Ažman-Juvan, Čegovnik idr., 2014; Ažman-JuvanAžman-Juvan idr., 2020; Šinkovec idr., 2018)

3.4.3 Dilatativna kardiomiopatija

Dilatativna kardiomiopatija (angl. dilated cardiomyopathy, DCM) je genetska bolezen srčne mišice, pri kateri pride do povečanja in slabšega krčenja LP (lahko tudi desnega), posledično pa do različnih aritmij, srčnega popuščanja in prevodnih motenj. Predstavlja enega najpogostejših vzrokov presaditve srca. Za DCM je značilna povečana masa prekatov brez debeljenja stene. (Ažman-Juvan, Čegovnik idr., 2014; Ažman-Juvan idr., 2020; Šinkovec idr., 2018)

Večinoma se deduje avtosomno dominantno, mutacije pa prizadenejo proteine, ki so del citoskeleta, miofilamentov, jedrne ovojnice in ionskih kanalčkov. (Šinkovec idr., 2018)

Vzroki za DCM so različni. Lahko je idiopatska (brez znanega vzroka), dedna (v 25-30%), postmiokarditična (po virusnem miokarditisu), slabše prekrvavitve srca (ishemija) ali pa nastane zaradi toksičnih substanc (alkohol, ionizirajoče sevanje). (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan idr., 2020)

Najpogostejše težave, ki so redke in različne ter ne preveč specifične, so slabša telesna zmogljivost, otekanje v gležnje, zadihanost in palpitacije. (Ažman-Juvan idr., 2020)

V primeru potrjene DCM je ukvarjanje s tekmovalnim športom dovoljeno le športnikom, ki imajo nizka tveganja in se ukvarjajo s športi z majhnimi statičnimi in do zmernimi dinamičnimi obremenitvami. (Ažman-Juvan idr., 2014)

3.5 Razlikovanje športnega srca in kardiomiopatije

Patološko sliko pri nepopolno izraženih ali zgodnjih oblikah kardiomiopatij (predvsem hipertrofični, aritmogeni in dilatativni) lahko v določenih primerih zamenjamo z rezultati srca s fiziološkimi prilagoditvami na dolgotrajno intenzivno vadbo. Za športnika je ključno pravilno razlikovanje, saj lahko napačna diagnoza privede ko nepotrebne diskvalifikacije, zamenjava patoloških simptomov za športno srce pa povečano tveganje za SCD. (Ažman-Juvan, 2014b)

Ker večina srčno-žilnih bolezni pri mladih športnikih poteka klinično nemo, sta anamneza in klinični pregled le malo občutljiva. Zato jih je potrebno aktivno iskati s preventivnimi pregledi in raziskavami. Evropska priporočila za preventivne preglede mladih športnikov obsegajo anamnezo, klinični pregled z meritvijo krvnega tlaka, za najbolj učinkovitega pa se je izkazal elektrokardiogram (EKG). Gre za zelo občutljiv presejalni test, saj je patološki pri do 95% bolnikov s hipertrofično kardiomiopatijo. Pri postavljanju diagnoze uporabljamo predvsem ehokardiografijo, lahko pa tudi slikanje srca z magnetno resonanco, 24-urno snemanje EKG in obremenitveni test. (Accetto idr., 2018; Ažman-Juvan, Čegovnik idr., 2014; Ažman-Juvan in Zupet, 2010)

Gensko testiranje se na področju dednih aritmogenih sindromov uporablja za potrditev diagnoze, zgodnjo ali dokončno diagnozo pri bolniku s prekrivajočimi se fenotipi, ali diferencialno diagnozo med genetskimi in negenetskimi oblikami bolezni. Uporabimo ga lahko tudi za identifikacijo asimptomatskih bolnikovih sorodnikov, ki imajo pozitiven genotip, in so lahko nagnjeni k tveganju za SCD. (Barretta idr., 2020)

Bistven napredek v molekularni genetiki dednih srčnih bolezni je doprinesel razvoj metode NGS, ki omogoča raziskovanje in identifikacijo širokega spektra genov, ki kažejo na kardiomiopatijo ali motnjo ionskih kanalčkov. (Barretta idr., 2020)

3.6 Metoda sekvenciranja po Sangerju

Sekvenciranje po Sangerju, znano tudi kot »sekvenciranje s prekinitvijo verige«, je metoda sekvenciranja »prve generacije«, ki so jo leta 1977 razvili Frederick Sanger in njegov ožji krog biokemikov. Uporabljena je bila v projektu človeškega genoma za določitev zaporedij relativno majhnih fragmentov človeške DNA (900 baznih parov ali manj). Zaradi 99,99% natančnosti velja za t. i. »zlati standard« za določanje zaporedja DNA, vključno s tistimi, ki so že bile sekvencirane z NGS. (Sanger Sequencing: Introduction, Principle, and Protocol, 2020)

V osnovi je bila metoda zasnovana za določanje zaporedja nukleotidnih baz v odseku DNA, ki niso daljši od 1000 baznih parov. Trenutno se v klinični praksi ugotavlja za diagnostično sekvenciranje enega gena in za testiranje za specifično različico družinskega zaporedja, za potrditev in dopolnitev različic, ki so identificirane z NGS. (Frost in van Campen, 2022)

Vzorec DNK, se združi v epruveti s primerjem, DNK polimerazo in DNK nukleotidi. Dodani so tudi štirje z barvilom označeni dideoksi nukleotidi s končno verigo. Mešanico najprej segrejemo, da denaturiramo matrično DNK, nato pa ohladimo, da se primer lahko veže na enoverižno matrico. Ko se primer veže, se temperatura ponovno dvigne, kar omogoči DNA polimerazi, da sintetizira novo DNK. DNA polimeraza bo nadaljevala z dodajanjem nukleotidov v verigo, dokler ne bo dodala dideoksi nukleotida namesto običajnega. Na tej točki ni mogoče dodati nobenih nadaljnjih nukleotidov. Ta postopek se bo ponavlja v 4 ciklih. Ko je kroženje končano, bo dideoksi nukleotid vgrajen na vsakem posameznem položaju ciljne DNK v vsaj eni reakciji. To pomeni, da bo cev vsebovala fragmente različnih dolžin, ki se bodo končali na vsakem od nukleotidnih položajev v izvorni DNK. Konci fragmentov bodo označeni z barvili, ki označujejo njihov končni nukleotid. Po končani reakciji, sledi kapilarna elektroforeza. Kratki drobcji se hitro premikajo skozi pore gela, dolgi pa počasneje. Ko vsak delček prečka »ciljno črto«, ga osvetli laser, kar omogoča zaznavo pritrjenega barvila. Najmanjši fragment (ki se konča le en nukleotid za primerjem) prvi prečka ciljno črto, sledi mu naslednji najmanjši fragment, itd.. Tako lahko iz barv barvil, ki jih ena za drugo registrira detektor, sestavi zaporedje prvotnega dela DNK en nukleotid naenkrat. Podatki, ki jih zabeleži detektor, so sestavljeni iz niza vrhov intenzivnosti fluorescence. Zaporedje DNK se odčita iz vrhov v kromatogramu. (DNA sequencing, b. d.)

3.7 Metoda sekvenciranja nove generacije

Sekvenciranje nove generacije (angl. Next-Generational Sequencing, NGS) je avtomatizirana in visoko zmogljiva tehnologija masovnega vzporednega sekvenciranja, kar pomeni, da določa vrsti red nukleotidov v celotnih genomih ali ciljnih regijah DNA ali RNA. (Introduction to NGS b. d.)

Metoda NGS obsega tri bistvene korake, in sicer: (Introduction to NGS b. d.)

- priprava knjižice,
- sekvenciranje,
- analiza podatkov.

Metoda omogoča genotipizacijo, genetsko testiranje in analizo posameznih genov, genskih plošč, eksomov, genomov, transkriptomov in epigenetskih testov za genetske motnje. (Richards in sod., 2015)

Tako pri NGS kot pri Sangerjevem DNA polimeraza dodaja fluorescentne nukleotide enega za drugim na rastočo verigo matične DNA. Vsak vključen nukleotid je identificiran s svojo fluorescentno oznako. (Introduction to NGS b. d.)

Ključna razlika med Sangerjevim sekvenciranjem in NGS pa je obseg sekvenciranja. Medtem ko Sangerjeva metoda sekvencira samo en fragment DNK naenkrat, je NGS masivno vzporedna in sekvencira na milijone fragmentov hkrati. Ta proces se pretvori v sekvenciranje več sto do tisoč genov hkrati. Prednosti NGS vključujejo: (Introduction to NGS b. d.)

- večja občutljivost za zaznavanje nizkofrekvenčnih različic,
- hitrejši čas obdelave za velike količine vzorcev,
- celovita genomska pokritost,
- večja zmogljivost in
- sposobnost ugotavljanja zaporedja več sto do tisoč genov ali genskih regij hkrati.

4 METODE

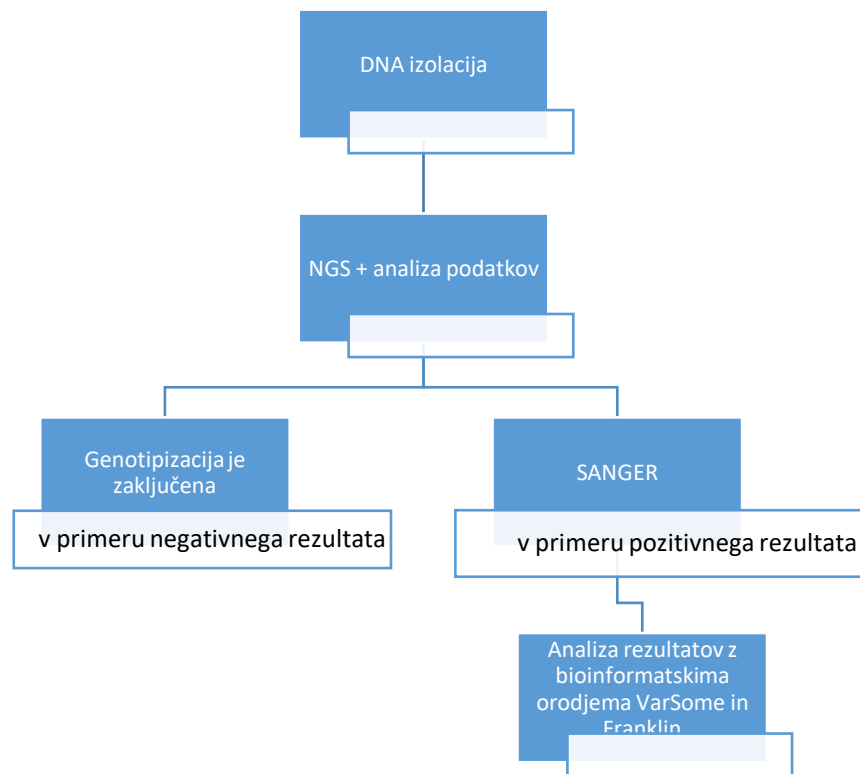
4.1 Vzorci

Obravnavali smo 41 športnikov, mlajših od 35 let, od tega 2 ženski in 39 moških, ki se ukvarjajo z različnimi športi, ki so povezani s povečano obremenitvijo in sicer: nogomet, triatlon in plavanje. Vsi športniki so opravili sistematski pregled za športnike na Inštitutu za športno medicino Maribor. Tekom pregleda jim je bila odvzeta kri za genetsko analizo za razlikovanje med patološkimi spremembami srca, značilnih za kardiomiopatije, in strukturnimi in fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce).

4.2 Potek dela

Potek celotne metodologije dela prikazuje Slika 1. Najprej smo iz 5 ml vzorca periferne venske krvi po standardnem operativnem postopku Kliničnega inštituta za genetsko diagnostiko UKC Maribor iz naključnega vzorca krvi (šifra V2A) izolirali DNA iz levkocitov. Nato so v laboratoriju Kliničnega inštituta za genetsko diagnostiko UKC Maribor pripravili DNA knjižnico, potrebno za NGS in izvedli NGS sekvenciranje. Kadar analiza NGS ugotovi prisotnost patogene ali verjetno patogene različice se jo z namenom potrditve sekvencira po Sangerju. Zaradi zahtevnosti in visoke cene postopka smo sami po spodaj opisanem protokolu analizirali en naključen vzorec krvi. Ostale vzorce je po enakem postopku analiziral laboratorij Kliničnega inštituta za genetsko diagnostiko UKC Maribor in nam posredoval rezultate sekvenciranja NGS in Sangerja za našo nadaljnjo analizo z bioinformatškima orodjema VarSome in Franklin.

Pri delu smo ves čas nosili zaščitni plašč, zaščitne rokavice, zaščitna očala, ter imeli spete lase.



Slika 1: Potek celotne metodologije dela

4.3 Ročna izolacija DNA iz levkocitov

4.3.1 Kemikalije

Pri izolaciji DNA iz levkocitov so bile uporabljene naslednje kemikalije:

- raztopina SLR (20 mM Tris HCl, 5 mM EDTA),
- raztopina SLB (20 mM TRIS, 50 mM NaCl, 10% SDS),
- destilirana voda,
- amonijev acetat,
- izopropanol,
- 100% etanol in
- TE (Tris HCl, EDTA).

4.3.2 Laboratorijska oprema

Pri delu smo potrebovali:

- centrifugirke,
- steklena čaša za odpad,
- centrifuga,
- stresalnik za centrifugirke,
- Pasteurjeva pipeta,
- epice,
- vrelna vodna kopel,
- stojalo za centrifugirke,
- avtomatska pipeta znamke Transferpette S Brand (volumen 20-200 μ l) in
- liofilizator.

4.3.3 Protokol dela

- Vzorcju periferne venske krvi (5 ml) (Slika 2) smo dolili raztopino SLR za lizo eritrocitov (20 mM Tris HCl, 5 mM EDTA) do oznake 30 ml



Slika 2: Začetni vzorec krvi

- raztopino smo močno pretresli - cilj je bil izpraznitev konice centrifugirke (pri obratu na glavo je morala biti konica prazna) (Slika 3)



Slika 3: Vzorec po mešanju

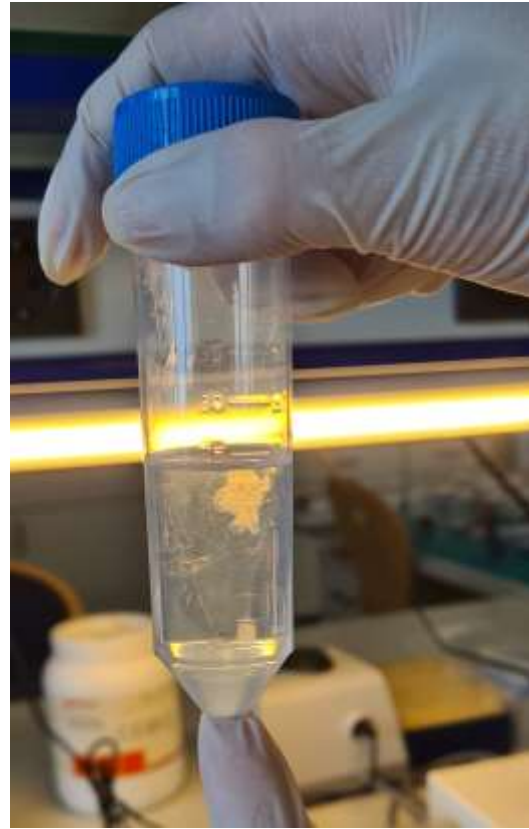


Slika 4: Centrifugiranje vzorca

- centrifugirali smo 8 do 10 min pri 1600 obratih/min (Slika 4),
- odlili smo supernatant v stekleno čašo, ki je bila namenjena za odpad,
- ponovno smo dolili raztopino SLR do oznake 30 ml,
- močno ročno premešali (centrifugiranje lahko oprijem levkocitov tako poveča, da smo jih morali zelo močno pretresti),
- centrifugirali smo 8 do 10 min pri 1800 obr/min,
- ponovno smo odlili supernatant v čašo za odpad, vendar ne do konca,
- stresali smo, da so levkociti počili oz., da je nastala homogena suspenzija celic,
- dodali smo 3 ml raztopine SLB (20 mM TRIS, 50mM NaCl, 10% SDS),
- dobro smo premešali s stresalnikom,
- dodali smo 1/3 volumna 9,5 M amonijevega acetata (za odstranitev proteinov in ostankov membran),
- ponovno smo stresali,
- zavreli smo destilirano vodo in lizat v vodni kopeli inkubirali 5 min (Slika 5),



Slika 5: Inkubacija vzorcev v vodni kopeli



Slika 6: Nitke DNA v vzorcu

- centrifugirali smo 8 do 10 min pri 3000 obr/min,
- supernatant smo previdno prelili v novo centrifugirko (z označeno šifro vzorca),
- dolili smo do 25 ml izopropanola in počasi z obračanjem raztopino premešali, da se je DNA oborila, ter spremljali nastanek meduze - nitke DNA (Slika 6),
- meduzo DNA smo s Pasteurjevo pipeto previdno prenesli v 1,5 ml epruvetko – epico (označeno) (Slika 7),



Slika 7: Meduza v Pasteurjevi pipeti

- dodali smo 100-200 μ l 100% etanola, epruvetko zaprli in v roki premešali s stresanjem, meduza se je pri tem spustila na dno epruvetke (Slika 8 in Slika 9)



Slika 8: Meduza v epruvetki



Slika 9: Meduza na dnu epruvetke

- odpipetirali smo supernatant (pazili smo, da nismo posrkali meduze DNA) in postopek ponovili,
- DNA smo posušili v liofilizatorju (10 min) (Slika 10),
- ko se je DNA posušila, je odstopila od stene epice (Slika 11),
- raztopili smo jo v 200 μ l raztopine TE (Tris HCl, EDTA) in premešali.



Slika 10: Sušenje DNA v liofilizatorju



Slika 11: DNA po sušenju

4.4 Sekvenciranje nove generacije (NGS)

Sekvenciranja zaradi visoke cene in zahtevnosti postopka nismo izvedli v našem laboratoriju. Vzorec smo poslali v analizo Kliničnemu inštitutu za molekularno genetiko UKC Maribor.

Priprava knjižnice: Tarčno sekvenciranje so izvedli s sekvenciranjem nove generacije – analiza NGS (angl. next generational sequencing). Za pripravo knjižnice po TruSight Cardio Sequencing Kit protokolu (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) so uporabili 100ng DNA izolirane iz periferne venske krvi. Sekvenciranje je potekalo po protokolu obojestranskega sekvenciranja v 2x150 ciklih na Illumina MiSeq sekvencatorju. Analiza dobljenih podatkov je bila izvedena z MiSeq Reporter programom 2.5.42.5 v skladu s postopkom BWA Enrichment.

BWA Enrichment postopek: V prvem koraku se je izvedla ločitev branih odsekov sekvenc po vzorcih na podlagi dodeljenih identifikacijskih zaporedij. V drugem koraku so se ustvarile datoteke FASTQ. Brani odseki sekvenc se nato poravnajo s celotnim referenčnim genom Homo sapiens (UCSC hg19) z uporabo Burrows-Wheeler Alinger (BWA 0.7.7-isis-1.0.2). Z uporabo GATK v 1.6-23-gf0210b3 programa se odstopanja v sekvenci branih sekvenc zapišejo v obliki VCF datotek.

Analiza VCF datotek: Za analizo datotek se uporablja Variant Studio program (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) in prostodostopna bioinformatična orodja in podatkovne baze za interpretacijo podatkov dobljenih z NGS analizo v skladu z American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) smernicami.

V analizo smo vključili naslednje gene:

ABCC9, ABCG5, ABCG8, ACTA1, ACTA2, ACTC1, ACTN2, AKAP9, ALMS, ANK2, ANKRD1, APOA4, APOA5, APOB, APOC2, APOE, BAG3, BRAF, CACNA1C, CACNA2D1, CACNB2, CALMI, CALR3, CASQ2, CAV3, CBL, CBS, CETP, COL3A1, COL5A1, COL5A2, COX15, CREB3L3, CRELDI, CRYAB, CSRP3, CTF1, DES, DMD, DNAJC19, DOLK, DPP6, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, EFEMP2, ELN, EMD, EYA4, FBN1, FBN2, FHL1, FHL2, FKRP, FKTN, FXN, GAA, GATAD1, GCKR, GJA5, GLA, GPDIL, GPIHBP1, HADHA, HCN4, HFE, HRAS, HSPB8, ILK, JAG1, JPH2, JUP, KCNA5, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNQ1, KLF10, KRAS, LAMA2, LAMA4, LAMP2, LDB3, LDLR, LDLRAP1, LMF1, LMNA, LPL, LTBP2, MAP2K1, MAP2K2, MIB1, MURC, MYBPC3, MYH11, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK, MYLK2, MYO6, MYOZ2, MYPN, NEXN, NKX2-5, NODAL, NOTCHI, NPPA, NRAS, PCSK9, PDLIM3, PKP2, PLN, PRDM16, PRKAG2, PRKARIA, PTPN11, RAF1, RANGRF, RBM20, RYR1, RYR2, SALL4, SCNIB, SCN2B, SCN3B,

SCN4B, SCN5A, SCO2, SDHA, SEPNI, SGCB, SGCD, SGCG, SHOC2, SLC25A4, SLC2A10, SMAD3, SMAD4, SNTAI, SOSI, SREBF2, TAZ, TBX20, TBX3, TBX5, TCAP, TGFB2, TGFB3, TGFBRI, TGFBRI, TMEM43, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TPM1, TRDN, TRIM63, TRPM4, TTN, TTR, TXNRD2, VCL, ZBTB17, ZHX3, ZIC3.

4.5 Sekvenciranje po Sangerju in sekvenciranje na SeqStudios

4.5.1 Kemikalije

Za metodo sekvenciranja po Sangerju smo potrebovali:

- Master Mix,
- primer TTN_c.80478dupA_F,
- primer TTN_c.80478dupA_R,
- genomsko DNA,
- H₂O,
- agarozna,
- TBE,
- barva Syder Green,
- pufer za elektroforezo,
- Buffer PB,
- Buffer PE,
- Buffer EB,
- ddH₂O,
- BDT V3.1 mix,
- F primer,
- SAM solution in
- BigDye Xterminator bead solution.

4.5.2 Laboratorijska oprema

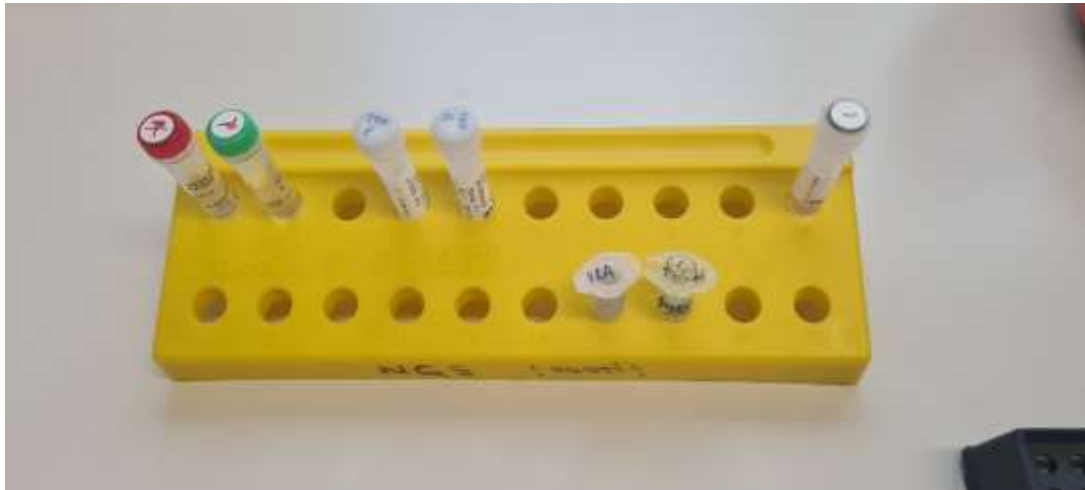
Uporabili smo naslednjo opremo:

- PCR aparat ProFlex PCR System,
- aparat za elektroforezo,
- glavničke,
- avtomatsko pipeto,
- modelček za gel,
- epice,
- Vilber aparat za slikanje gelov,
- QIAQuick PCR Purification Kit,
- Nanodrop spektrofotometer,
- SeqStudio sekvenator,
- BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit,
- BigDye Xterminator Purification Kit,
- MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip,
- MicroAmp™ Optical 8-Cap Strips 4,
- IKA vortex 3,
- MicroAmp™ Optical 96-well Tray/Retainer set in
- čisto Septa za SeqStudio™ Genetic Analyzer.

4.5.3 Protokol dela

1. del: Priprava PCR produktov

- V epico smo odpipetirali 25 μ l Master Mix, 20 μ l H₂O, 2 μ l + 2 μ l primerjev F + R in 1 μ l genomske DNA (Slika 12),



Slika 12: Vzorci in začetne kemikalije

- vzorce smo ustrezno namestili in na aparatu ProFlex PCR System izbrali program MM60.

Preverjanje PCR rezultatov s kapilarno agarozno elektroforezo:

- 0,75 g agaroze smo dali v čašo, dopolnili do 25,0 mL TBE, v mikrovalovni pečici segrevali do vrelišča, da smo dobili homogeno raztopino,
- raztopino smo nalili v modelček za gel in namestili 2 glavnička (Slika 13),
- počakali smo 10 min, da se je gel strdil,



Slika 13: Priprava gela za elektroforezo



Slika 14: Fragmenti pomnožene DNA na ekranu

- odstranili smo glavnička, gel namestili na napravo in nalili pufer,
- v »žepke« gela smo odpipetirali 2 mL PCR produkta in 3 mL barve Syder Green,
- namestili smo elektrode in nastavili elektroforezo na 160 V, 400 mA za 10 min,
- gel smo previdno odstranili, ter ga položili v komoro aparata Vilber za slikanje gela,
- ker je pomnoževanje DNA s PCR uspelo, so se nam na ekranu pojavile ustrezne črtice, ki označujejo fragmente (odseke) pomnožene DNA (Slika 14).

2. del: Čiščenje PCR produktov z »QIAquick PCR Purification KIT-om« na QIAcube

- 50 µl PCR produkta smo dodali 50 µl H₂O,
- na ustrezno mesto v aparatu po protokolu smo namestili reagente Buffer PB, Buffer PE in Buffer EB,
- v »rotor adapter« smo na ustrezno mesto namestili QIAquick kolono za čiščenje PCR produktov (Slika 15),



Slika 15: Aparat QIAcube in reagenti

Določanje koncentracije PCR produkta:

- s spektrofometrom Nanodrop smo določili koncentracijo (ng/µl) očiščenega PCR produkta,
- glede na koncentracijo PCR produkta smo določili količino PCR produkta (Tabela 1),
- po spodnji enačbi smo izračunali volumen PCR produkta (µl) in volumen ddH₂O (µl):

$$V(\text{PCR} + \text{H}_2\text{O}) = 7,5 \mu\text{l}$$

Tabela 1: Koncentracija PCR produkta [ng/µl] glede na količino PCR produkta [µl]

Koncentracija PCR produkta [ng/µl]	Količina PCR produkta [µl]
0 – 25	1,0
25 – 50	0,5

3. del: Priprava očiščenih PCR produktov z »BigDye Xterminator Purificaiton« Kit-om za sekvenciranje na SeqStudio sekvenatorju

- V epico odpipetiramo 1,5 µl BDT V3.1 mix-a,
- odpipetirali smo izračunanih 7,0 µl ddH₂O,
- 1 µl F primerja smo odpipetirali v epico,
- dodali smo 0,5 µl očiščenega PCR produkta,
- zagnali smo PCR program BigDyeE PCR Run.

4. del: Čiščenje PCR produktov z »BigDye Xterminator Purification« Kit-om

- 10 µl raztopine BigDye Xterminator bead solution smo odpipetirali v MicroAmpTM Optical 8-Tube Strip in dodali 10 µl vzorca,
- zaprli smo z MicroAmpTM Optical 8-Cap Strips 4,
- stresali smo vsaj 30 min na 3000 rpm (IKA vortex 3, max speed),
- po stresanju smo centrifugirali 1000 x g 2 min,
- stripe smo vstavili v poseben plastičen podstavek (MicroAmpTM Optical 96-well Tray/Retainer set) in pokrili s čisto Septo za SeqStudioTM Genetic Analyzer (gumijast nastavek) in nežno pritisnili,
- pred vstavljanjem v aparat smo še enkrat na kratko centrifugirali.

5. del: Sekvenciranje na SeqStudiosu

- Protokol smo pripravili na z uporabo Plate Manager-ja,
- nastavili smo tip aplikacije „Sequencing“,
- pod zavihkom „Plate“ smo vpisali ime vzorca, ki se je nahajal na določeni poziciji,
- izbrali smo ustrezen „Dye Set“ in „Run module“; pri čiščenju z BigDye Xterminator kit-om, smo izbrali modul s pripono „BDX“,
- pripravljen protokol smo poimenovali in shranili „Save“.

6. del: Analiza sekvence

- Zagnali smo program Sequencing Analysis 5.1 in vpisali ustrezno geslo,
- dodali smo vzorce formata „.ab1“: File > Add Samples,
- izbrali smo Analysis > Analysis Protocol Manager in izbrali SANGER protokol,
- nato smo kliknili Apply to Selected Samples,

- za začetek analize smo kliknili zeleno puščico,
- sekvenco smo prenesli v ustrezen delovni list za določanje znane spremembe.

4.6 Analiza podatkov z bioinformatičkima orodjema VarSome in Franklin

Podatke, ki smo jih dobili z NGS analizo, smo razvrstili s pomočjo različnih programskih orodij, ki omogočajo razvrščanje ugotovljenih različic, glede na kriterij razvrščanja po patogenosti oz. benignosti skladno s priporočili priročnika ACMG Standards and guidelines. Uporabili smo programski orodji VarSome (<https://varsome.com/>) in Franklin (<https://franklin.genoox.com>), ki sta prosto dostopni na spletu ter omogočata klasifikacijo posamezne različice glede na kriterije po ACMG Standards and guidelines v pet različnih skupin, in sicer v:

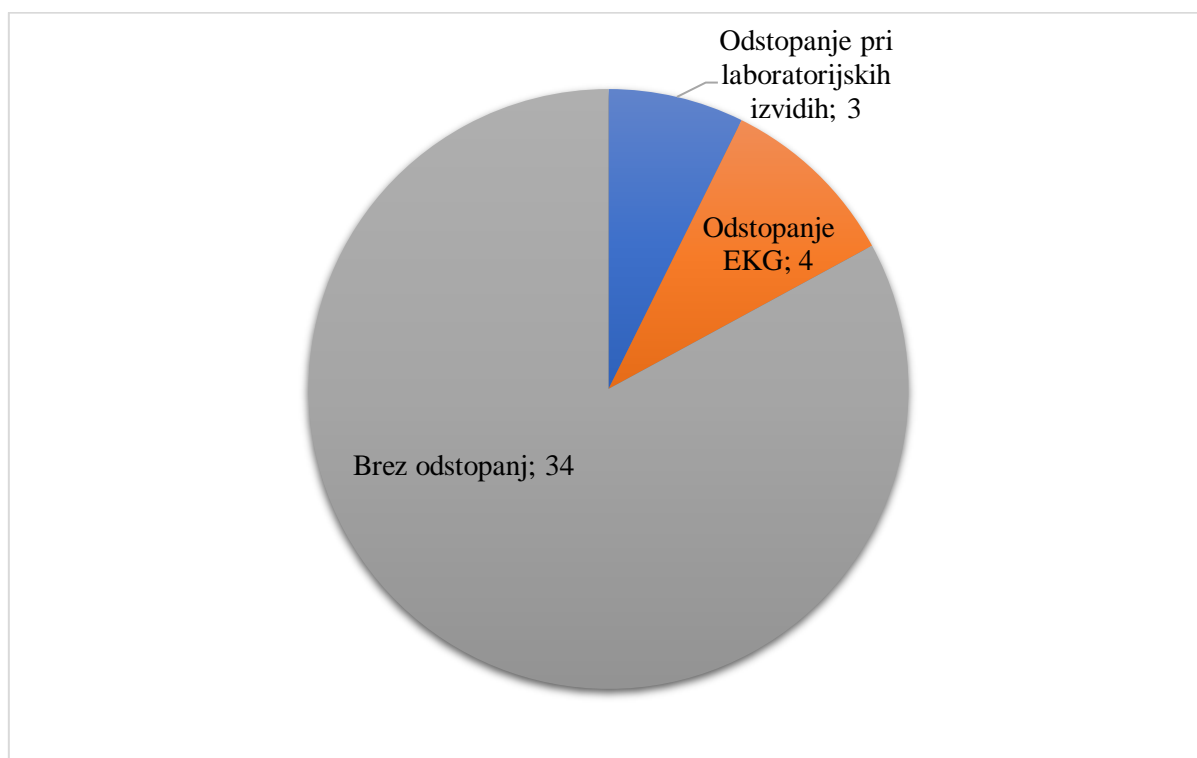
- patološka različica (angl. Pathogenic),
- verjetno patološka različica (angl. Presumed pathogenic),
- različica z nejasnim kliničnim pomenom (angl. Unknown significance),
- verjetno benigna različica (angl. Presumed benign),
- benigna različica (ang. Benign).

Teh pet skupin je ustvarjenih na podlagi dveh kriterijev razvrščanja različic po patogenosti oz. benignosti, ki so določeni glede na splošne podatke o različici in primerjavi podatkov v bazah različic. Če različica ne ustreza nobenemu izmed teh dveh kriterijev ali pa so dokazi za patogenost oz. benignost kontradiktorni, se klasificira kot različica z nejasnim kliničnim pomenom (angl. Variant of unknown significance - VOUS). Za nekatere VOUS različice se lahko z nadaljnjimi raziskavami spremeni klasifikacija in tako pomembno vpliva na prognozo bolezni, terapijo in verjetni izid zdravljenja bolnika s sumom na srčno obolenje. Za natančnejšo opredelitev pomena različic, ki vsekakor predstavljajo možen vzrok za klinično sliko preiskovancev, se priporoča analiza segregacije različic v družini in ponovna klasifikacija ugotovljenih različic v 2-3 letih. (Richards idr., 2015)

5 REZULTATI

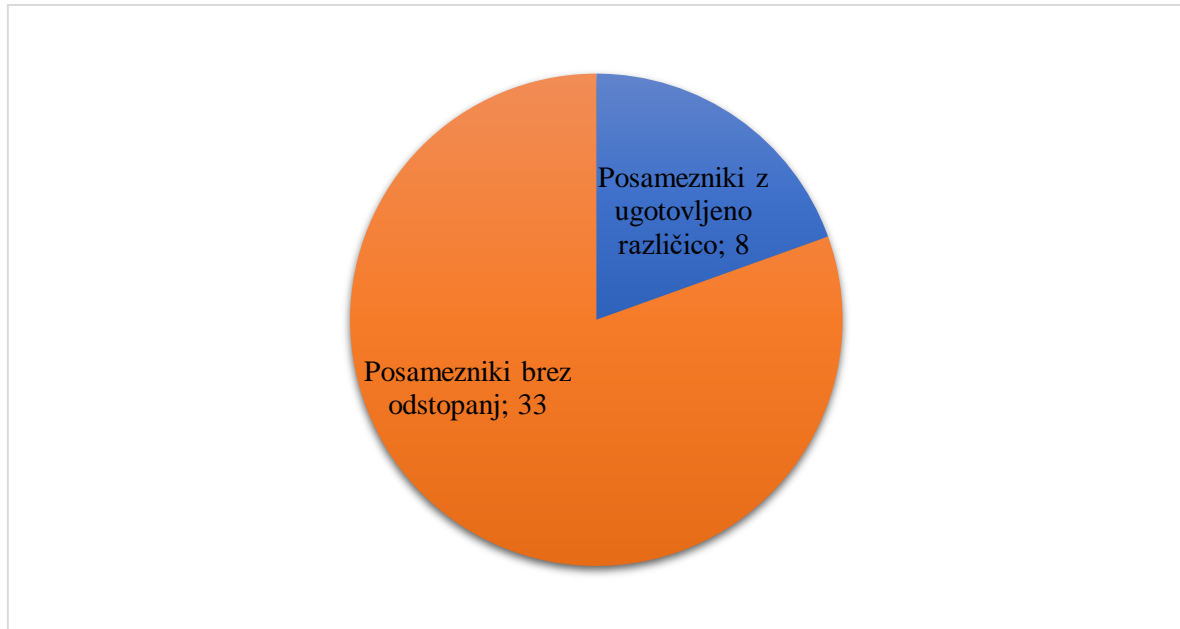
Rezultati NGS analize vzorcev, analize podatkov z bioinformatiskima orodjema Franklin in Varsome, ter podatki o odstopanju pri laboratorijskih izvidih in EKG pridobljenih s sistematskega pregleda so zbrani v Tabeli 1.

Odstopanja pri laboratorijskih preiskavah, ki so obsegala povišan holesterol, povišane trigliceride, ali povišano glukozo, so bila na sistematskem pregledu ugotovljena pri 3 športnikih. Odstopanje pri EKG se je pokazalo pri 4 športnikih. Na sistematskem pregledu je bilo 34 športnikih brez posebnosti in odstopanj. Delež ugotovljenih odstopanj na sistematskem pregledu prikazuje Graf 2.



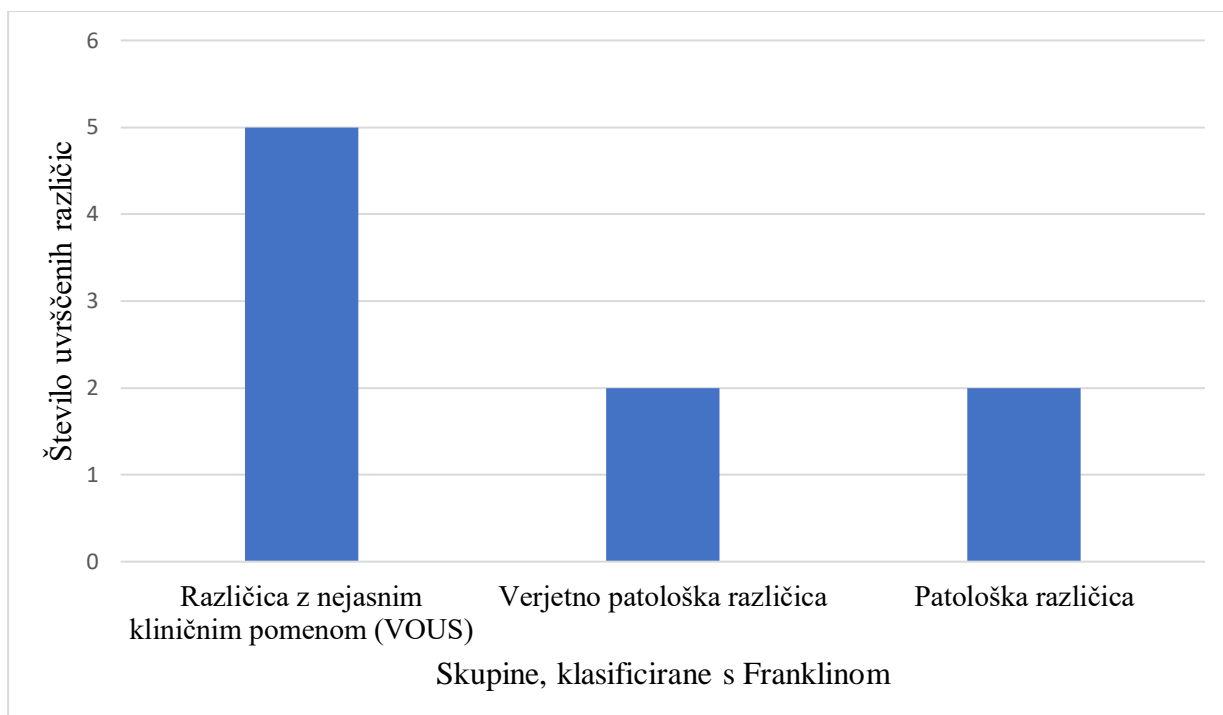
Graf 2: Ugotovljena odstopanja na sistematskem pregledu športnikov pri laboratorijskih izvidih in EKG

Testiranih je bilo 41 mladih športnikov. Z NGS smo ugotovili odstopanje pri 8 športnikih (Graf 3). S sekvenciranjem po Sangerju so v laboratoriju za genomiko UKC Maribor potrdili vse različice ugotovljene z NGS.



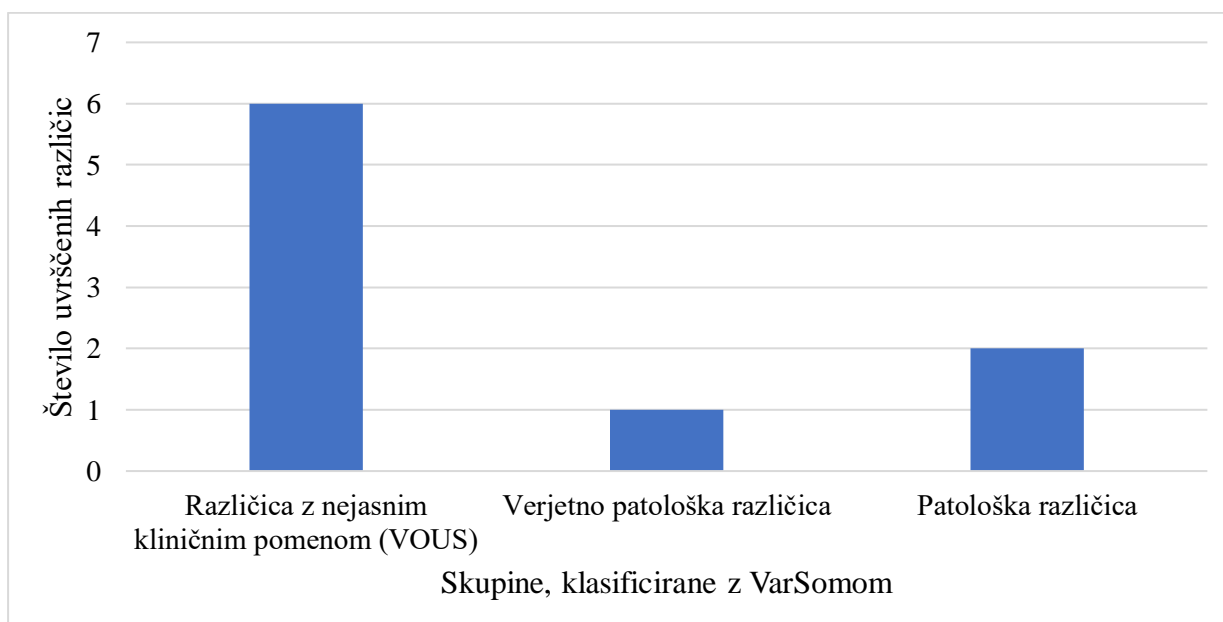
Graf 3: Rezultati sekvenciranja NGS

Z bioinformatičnim orodjem Franklin so bile ugotovljene različice z NGS metodo najpogosteje (v 5 primerih) različice klasificirane v skupino z nejasnim kliničnim pomenom (VOUS). Med verjetno patološke in patološke različice je Franklin razvrstil po 2 različici v vsako skupino. Razvrstitev v posamezne skupine prikazuje Graf 4.



Graf 4: Rezultati klasifikacije različic z bioinformatičnim orodjem Franklin

Ko smo rezultate NGS analizirali s bioinformatičnim orodjem VarSome, smo 6 različic razvrstili v VOUS, med verjetno patološko različico se je klasificirala le 1 različica, v kategorijo patoloških različic, sta se uvrstili 2 (Graf 5).



Graf 5: Rezultati klasifikacije različic z bioinformatičnim orodjem VarSome

5.1 Predstavitev primera

Vzorec, ki smo ga analizirali, je bil označen s šifro V2A. Gre za 15 letno žensko, ki redno intenzivno trenira triatlon. Z metodo NGS smo naključno odkrili patogeno različico. Za ugotovljeno različico so se izdelali začetni oligonukleotidi, s katerimi smo pomnožili na genomski DNA področje, ki je obsegalo to spremembo v obsegu 200 bp. S Sangerjem smo različico potrdili, in hkrati testirali družinske člane (mamo, očeta in brata) za razjasnitev pojava različice. Razširjena analiza je pokazala, da je le-ta podedovana po mami športnice (004752), oče (004938) in brat (V1V) pa na tem mestu nimata potrjene različice, kar prikazujeta Sliki 17 in 18.

Iz izvida je razvidno, da gre pri obeh za duplikacijo adenina oz. timina. na C-terminalnem področju gena TTN. Tovrstne različice so povezane predvsem z recesivnimi titinopatijami, ki se kažejo zlasti s prizadetostjo perifernih mišic. Mutacije so prav tako povezane z družinsko hipertrofično kardiomiopatijo.

6 DISKUSIJA

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti, ali je z metodo NGS možno razlikovati med patološkimi spremembami srca, značilnih za kardiomiopatije, in strukturnimi in fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce). Hkrati smo želeli ugotoviti, ali je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za potrditev genetskih sprememb, ugotovljenih z metodo NGS. Zanimalo nas je tudi, ali je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za določanje segregacije znane družinske mutacije, in ali sta bioinformatična orodja VarSome in Franklin med seboj primerljiva in učinkovita za klasifikacijo genetskih sprememb ugotovljenih z metodo NGS.

Rezultati naše raziskave se skladajo z izsledki študije *Screening of sarcome gene mutations in young athletes with abnormal findings in electrocardiography*, saj smo pri vseh treh športnikih, ki so imeli odstopanje na laboratorijskih preiskavah ugotovili različico, ter potrdili pomen sistematskih pregledov. Odstopanja smo našli z ameriško raziskavo, ki jo navaja Ažman-Juvan (2014a), v kateri naj bi posumili na srčno obolenje le pri 3% športnikov in na koncu končno diagnozo postavili pri 1%.

Skupno smo testirali 41 mladih športnikov. Z NGS smo ugotovili odstopanja pri 8 športnikih. Od teh 8 primerov jih je imelo odstopanje pri laboratorijskih izvidih opravljenih tekom pregleda za športnike v 3 primerih. Za vse te 3 primere smo ugotovili, da gre za genetski vzrok. 2 športnika od teh 8 sta imela odstopanje na EKG, opravljenim tekom pregleda za športnike. Pri obeh smo tako našli genetski vzrok, kar pomeni, da gre pri teh dveh športnikih najverjetneje za kardiovaskularno obolenje in ne za športno srce. Za natančnejšo diagnostiko je potrebno opraviti dodatne preiskave (ultrazvok srca, EKG pod obremenitvijo, MR srca) za preprečitev kakršnihkoli resnih ali celo za življenje ogrožajočih zdravstvenih zapletov športnika.

Pri ostalih treh od skupno 8 smo naključno našli genetske spremembe značilne za kardiovaskularna obolenja, kar pomeni, da je prav tako potrebno opraviti dodatne preiskave (ultrazvok srca, EKG pod obremenitvijo, MR srca), da se izključijo kakršnekoli nepravilnosti srca, ki bi lahko predstavljale grožnjo za zdravje športnika.

Tekom sistematskega pregleda športnikov so bila EKG odstopanja ugotovljena pri 4 športnikih. Pri 2 smo le-to potrdili z NGS, pri drugih 2 pa je bil NGS brez odstopanj. S tem potrdimo **prvo hipotezo**, da lahko z NGS razlikujemo med športnim srcem in kardiomiopatijo.

Drugo hipotezo, s katero smo predvidevali, da *bosta oba orodja med seboj primerljiva in učinkovita za določanje in kvalifikacijo genetskih sprememb, ki omogočajo učinkovito razlikovanje med patološkimi spremembami na srcu (srčno-žilne bolezni, zlasti kardiomiopatije, ki lahko povečajo tveganje za nenadno srčno smrt) in strukturnimi in fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo (športno srce), ugotovljenih z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS), lahko potrdimo. Z obema orodjema smo uspešno klasificirali ugotovljene različice in dobili primerljive rezultate. V 6 klasifikacijah od 9 so se rezultati analize in razvrstitve skladale. Do neujemanja v rezultatih je prišlo v 3 klasifikacijah različic od 9. V vseh treh primerih je prišlo do odstopanj v klasifikaciji med različico z nejasnim kliničnim pomenom (VOUS) in verjetno patološko različico. VarSome je različice, v katerih se je razlikovala klasifikacija, pogosteje uvrstil med VOUS (2 krat), Franklin pa med verjetno patološko različico (2 krat). Kljub trem odstopanjem lahko trdimo, da sta programska orodja primerljiva, zaradi manjših odstopanj pa omogočata še natančnejšo opredelitev variante.*

Tretjo hipotezo, ki je predpostavljala, da *je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za potrditev genetskih sprememb, že ugotovljenih z metodo sekvenciranja nove generacije (NGS), lahko potrdimo. Vse različice, ki smo jih ugotovili z NGS, so v laboratoriju za genomiko UKC Maribor z metodo sekvenciranja po Sangerju potrdili. Prav tako smo potrdili patogeno različico na izbranem vzorcu in uspešno ugotovili vzorec dedovanja. Trdimo lahko, da je metoda sekvenciranja po Sangerju uspešna in učinkovita za sekvenciranje malega znanega odseka na genomu. To je tudi še en argument, ki potrjuje, da je NGS primerna metoda za razlikovanje, ki v naši raziskavi »ni naredila napake«.*

Z rezultati naše raziskave lahko potrdimo tudi **četrto hipotezo**, ki je predpostavljala, da *je sekvenciranje po Sangerju učinkovita metoda za določanje segregacije znane družinske mutacije. Ko smo potrdili patološko različico gena TTN pri izbranem vzorcu, smo na genetsko testiranje dali tudi ostale družinske člane. Ker smo točno poznali odsek, kjer naj bi se nahajala različica, smo s sekvenciranjem po Sangerju uspešno sekvencirali genom mame, očeta in brata. Ugotovili smo, da je deklica različico podedovala po mami, oče in brat pa sta brez odstopanj.*

Ker smo sekvencirali le genom družinskih članov enega posameznika, za nadaljnje raziskovanje predlagamo, da raziščemo genetsko ozadje družinskih članov vseh posameznikov s patogeno različico. Na tak način bi lahko odkrili vzorec dedovanja in dali prognozo, kaj se bo dogajalo s potomci. Priporočljivo je tudi razširiti raziskavo na večji nabor genov. Preverili bi lahko, ali se lahko metoda NGS učinkovito uporablja tudi za razlikovanje drugih bolezenskih

stanj, in jo postopno uvajali v klinično prakso. Predlagamo tudi, da bi v raziskavo vključili enakomerno razporeditev po spolu. Glede na to, da so bile vse ugotovljene različice potrjene s sekvenciranjem po Sangerju, prav tako priporočamo, da se razmisli glede potrjevanja ugotovljenih različic z NGS metodo, saj 100% ujemanje med NGS in sekvenciranjem po Sangerju nakazuje, da je zanesljivost NGS metode dovolj visoka. Na tak način bi prihranili čas in denar.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Z raziskovalno nalogo smo želeli poudariti pomen sistematskih pregledov mladih športnikov. Dokazali smo smiselnost genetskega testiranja, saj mnoge bolezni, ki so za športnika lahko usodne, potekajo klinično nemo, zato jih je treba aktivno iskati. Če jih pravočasno odkrijemo, lahko preprečimo smrt, jih zdravimo in upočasnimo napredovanje nekaterih bolezni. Preprečevanje nenadnih srčnih smrti mladih športnikov z namenom odkrivanja kardiomiopatij in aritmij ter razlikovanja med patološkimi spremembami srca, značilnih za kardiomiopatije, in strukturnimi in fiziološkimi prilagoditvami srca na dolgotrajno intenzivno redno telesno vadbo je izjemnega pomena. Na tak način se športniki izognejo nepotrebnim diskvalifikacijam zaradi napačne diagnoze, na drugi strani pa zmanjšajo tveganje za nenadno srčno smrt in lahko prilagodijo telesno aktivnost posameznim srčno-žilnim boleznim. Z raziskovalno nalogo želimo spodbuditi redne preventivne sistematske preglede športnikov, ki bi vključevali 12-kanalni EKG, ultrazvok srca in laboratorijske preiskave krvi. V primeru odstopanj rezultatov testiranja, bi mladega športnika usmerili na nadaljnje preiskave in genetsko testiranje, kjer bi raziskali genetsko ozadje. Ustrezna metoda, ki smo jo z raziskovanjem potrdili, in omogoča hiter in celovit pristop k analizi je metoda NGS. S tem postopkom lahko v enem poskusu simultano analiziramo vse gene, kar je glede na ostale metode sekvenciranja ceneje in hitreje, in je zato primerna metoda za pravilno razlikovanje med fiziološkimi prilagoditvami in srčno-žilnimi boleznimi.

8 ZAKLJUČEK IN SKLEPI

Z raziskovalno nalogo smo potrdili prvo hipotezo, da je metoda NGS primerna za razlikovanje med športnim srcem in kardiomiopatijami. Vse patogene različice so uspešno potrdili s sekvenciranjem po Sangerju, hkrati pa našli variante oz. patogenost pri vzorcih, ki so bili na sistematskem pregledu pri bodisi EKG ali laboratorijskih preiskavah brez posebnosti.

Potrdili smo tudi drugo hipotezo. Z bioinformatiskima orodjema VarSome in Franklin je bilo mogoče uspešno klasificirati različice ugotovljene z NGS.

Ugotovili smo, da je sekvenciranje po Sangerju v skladu s trenutno uporabnostjo v klinični praksi učinkovito pri potrjevanju različic ugotovljenih z NGS in dopolnjevanju te metode. S segregacijo gena *TTN* smo potrdili, da je tovrstno sekvenciranje učinkovito na manjšem tarčnem naboru genov, in da je natančno.

Ker smo uspešno raziskali družinsko ozadje naključnega patogenega vzorca, smo potrdili četrto hipotezo. S sekvenciranjem po Sangerju si lahko pomagamo pri razlaganju patogene različice. Ugotovili smo torej, da je ta metoda primerna za segregacijsko analizo patogene različice pri kardiomiopatijah.

Da bi vsaj delno zaščitili dragoceno življenje mladih športnikov in prepoznali potencialne patogene različice, priporočamo redne preventivne sistematske preglede, po vzorcu italijanskih (izčrpna anamneza, EKG, laboratorijske preiskave krvi, merjenje krvnega tlaka...). Če bi odkrili potencialno patogenost, bi športnika napotili na genetsko testiranje, kjer bi z metodo uporabljeno v raziskovalni nalogi lahko učinkovito razlikovali med patološkimi spremembami na srcu in športnim srcem.

9 VIRI IN LITERATURA

Accetto, R., Aleš Rigler, A., Ambrožič, A., Andoljšek, D., Anžej Doma, S., Arno1, M., ... Zavratnik, A. (2018). Interna medicina. V M. Košnik in D. Štajer (ur.), Ljubljana: Medicinska fakulteta Ljubljana, Slovensko zdravniško društvo in Knjigotrštvo Buča d.o.o.

Ažman-Juvan, K. (2014a). Nenadna srčna smrt pri športnikih. *Vita. zdravstvenovzgojna revija*, 21(82), 18–19. Digitalni repozitorij raziskovalnih organizacij Slovenije. Pridobljeno s https://www.revija-vita.com/vita/82/Nenadna_sr%C4%8Dna_smrt_pri_%C5%A1portnikih

Ažman-Juvan, K. (2014b). Razlikovanje športnega srca in kardiomiopatije. *Medicinski razgledi*, 53(4), 537-542. Pridobljeno s <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-YVZNLTTY>

Ažman-Juvan, K. in Zupet, P. (2010). Preprečevanje nenadnih srčnih smrti pri mladih športnikih. *Zdravniški vestnik*, 79(11), 774-781. Pridobljeno s <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-8HME90RV>

Ažman-Juvan, K., Jug, B., Jan, M., Prokšelj, K. (2020). Srce in šport. Ljubljana: Olimpijski komite Slovenije – Združenje športnih zvez.

Ažman-Juvan, K., Čegovnik, B., Čerček, M., Matevž, J., Jug, B., Kolšek, B., ... Žiberna, L. (2014). Športna kardiologija. V K. Ažman-Juvan in B. Jug (ur.), Ljubljana: Združenje kardiologov Slovenije.

Barretta, F., Mirra, B., Monda, E., Caiazza, M., Lombardo, B., Tinto, N., Scudiero, O., Frisso, G., in Mazzaccara, C. (2020). The Hidden Fragility in the Heart of the Athletes: A Review of Genetic Biomarkers. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6682. Pridobljeno s <https://doi.org/10.3390/ijms21186682>

DNA sequencing. (b. d.). Pridobljeno s <https://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/dna-sequencing>

Duncan, S. (2016). *Hypertrophic Cardiomyopathy vs Athletic Heart Syndrome*. Pridobljeno s [Hypertrophic Cardiomyopathy vs Athletic Heart Syndrome \(genre.com\)](https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/sanger-sequencing/)

Frost, A. in van Campen, J. (8. 6. 2022). *Sanger sequencing*. Pridobljeno s <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/sanger-sequencing/>

Introduction to NGS. (b. d.). Pridobljeno s <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., Rehm, H. L., in ACMG Laboratory Quality Assurance Committee (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. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 17(5), 405–424. Pridobljeno s <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>

Sanger Sequencing: Introduction, Principle, and Protocol. (21. 2. 2020). Pridobljeno s <https://www.genomicseducation.hee.nhs.uk/genotes/knowledge-hub/sanger-sequencing/>

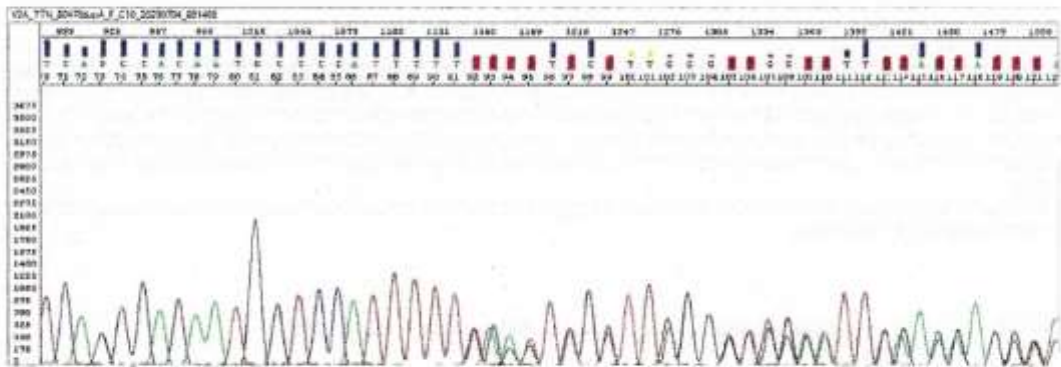
Starc, R., Marušič, D., Starc, S. (2005). Vpliv telesne dejavnosti na zdravje in nenadno smrt. *Zdravstveno varstvo*, 44(4), 223-231. Pridobljeno s <https://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-CEFOIGYT>

Šinkovec, M., Antolič, B., Poglajen, G., Tasič, J., Toplišek, J., Žižek, D., ... Komel, R. (2018). Genetski vzroki aritmij in kardiomiopatij. V M. Šinkovec (ur.), Ljubljana: Klinični oddelek za kardiologijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana in Združenje kardiologov Slovenije.

PRILOGE

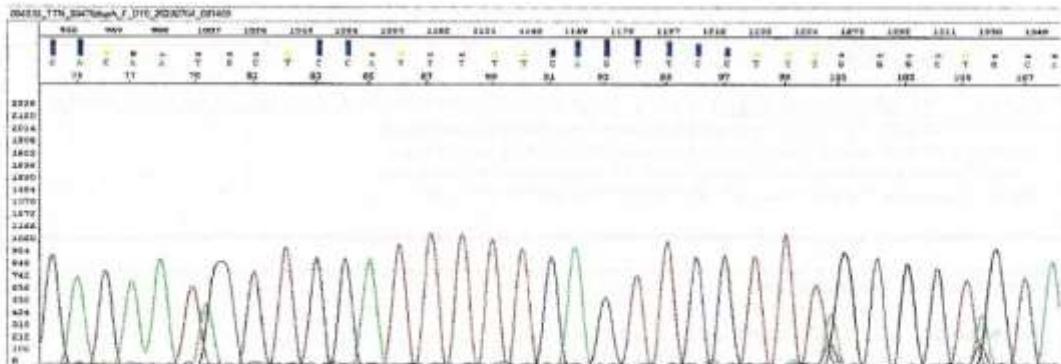
V2A

F:
ACCTTGAMACGGAACTGATATTCTTGTCCAGAACTCAAACCAGTAACAACGCATTACAGACTTTGGATTGAGCCACAAT
GCTCCATTTTTYMRKTYCYTTGGGSYGGMWTTYMAMMAMSKAACCCARGAAYCCGGCAACSSCCWCCWGGTCCRGGTTCC
CCCCC



004938

F:
GCCTTGAMCGGACTGATATTCTTGGTCCAGAACTCAAACCAGTAACAACWGCATTACAGACTTTGGATTGAGCCACAATG
CTCCATTTTTGAGTTCCTTTGGGCTGCATTTCAACAACGTACCCAGGACTCTGCTACCGCCATCATGTTTCAGWTTTCTC
CCACAAGTG

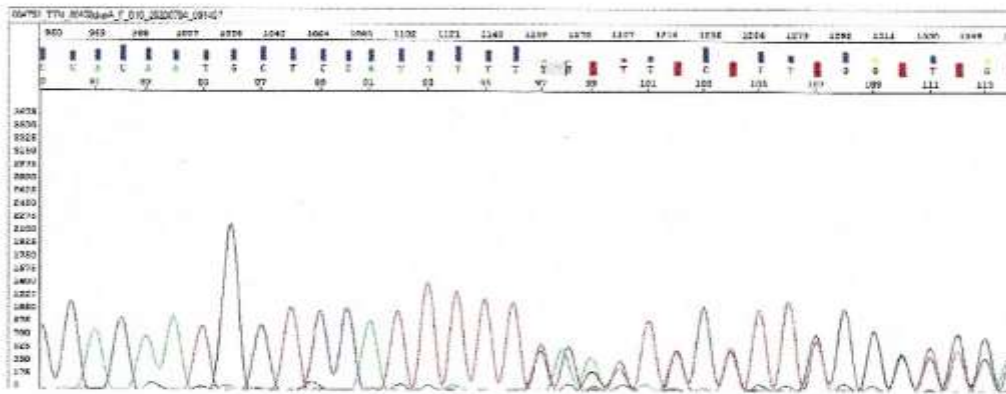


Slika 16: Prikaz segregacije genoma na mestu ugotovljene različice pri deklici (V2A) in očetu (004938)

004752

F:

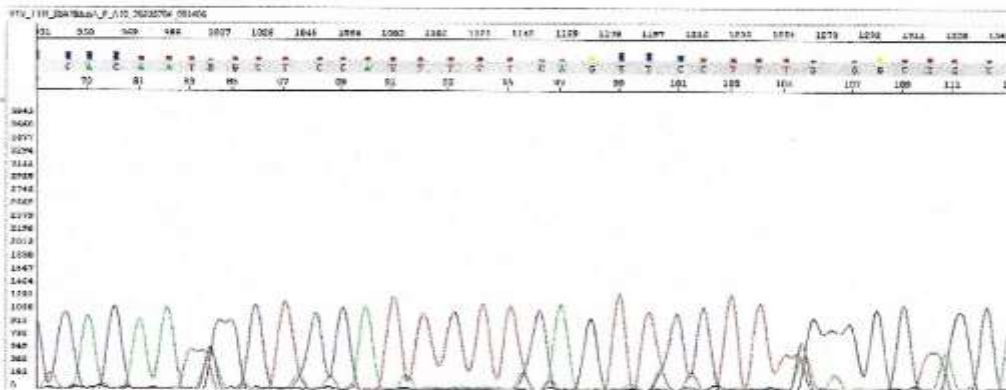
TAAGSCCATGAAMACGGAAACTGATATTCTTGTCCAGAACTCAACCAGTAACAACCTGCATTACAAGACTTTGGATTACGCC
ACAATGCTCCATTTTTYMRITTYCYTTKGGSTKGMWTTYMAMMAMSKAACCCCAAGAYCCGGYAMCSCMWYMWGGTCCP
GGTCCCCCCCCCMA



V1V

F:

CCTTGACCCGGACTGGAAATTTCTTGGTCCAGAACTYCAAACCAGTAACAACCTGGCATTACAGACTTMGGATTCAGCCAC
AATMCTCCATTTTTTCAGTTCCTTTGGCTGCAITTTCAACAACGTAACCCAGGACTCYGCTACCGCCATCAYGTTCAGA
TTTCTCTCAAA



Slika 17: Prikaz segregacije genoma na mestu ugotovljene različice pri mami (004752) in bratu (V1V)

Tabela 2: Vsi rezultati NGS sekvenciranja, analize z bioinformatiskima orodjema in podatki o športnikih

SPOL	DNA	NGS	Franklin (reanaliza)	VarSome (reanaliza)	Odstopanje pri laboratorijskih izvidih	Odstopanje EKG
M	54544	Brez odstopanj.				DA
M	54543	Brez odstopanj.				
M	54542	Brez odstopanj.				
M	54541	Brez odstopanj.				
M	54540	JPH2 20-42788427-C-T het missense; rs 1235114984; JPH2(NM_020433.5):c.1000G>A (p.Gly334Ser); CV /; gerp 3.12; gnomAD 8.08x10-6; InSilico Damaging /; Cardio Class /; VarSome VOUS (PM2); OMIM #613873 (HCM 17, AD) LDLR 19-11210912-C-G het missense; rs 2228671; LDLR(NM_000527.5):c.81C>G (p.Cys27Trp); CV /; gerp 5.31; gnomAD 1.6x10-5; InSilico Damaging /; Cardio Class VOUS (PM2, PP3); VarSome Likely Pathogenic (PM2, PM5, PP3, PP2, PP5); OMIM #143890 (Hypercholesterolemia, AD)	JPHZ: VOUS (PM2, PP3) LDLR: Pathogenic (PM1, PP2, PM2, PM5, PP3, PP5)	JPHZ: VOUS (PP3, PM2, BP1) LDLR: Pathogenic (PP5, PP3, PM1, PM5, PM2)	Povišan holesterol	
M	54539	Brez odstopanj.				
M	54538	DTNA 18-32374029-A-G het missense; rs 1057518968; DTNA(NM_001390.4):c.177A>G (p.Ile59Met); CV374197 Conflicting (likely p5W/VOUS = 2/1); gerp 5.43; gnomAD 7.97x10-6; InSilico Damaging /; Cardio Class /; VarSome VOUS (PP3, PM2, PP5); OMIM #604169 (Left ventricular noncompaction, AD)	VOUS (PM2, PP5) → LP	VOUS (PM2, PP5, BP1)		DA
M	54537	Brez odstopanj.				
M	54536	Brez odstopanj.				
M	54535	Brez odstopanj.				
M	54534	Brez odstopanj.				
M	54533	Brez odstopanj.				
M	54532	Brez odstopanj.				
M	54531	Brez odstopanj.				
M	54530	Brez odstopanj.				
M	54529	Brez odstopanj.				DA
M	54528	MYH11 16-15812194-C-T missense het; MYH11(NM_001040114.1):c.5294G>A (p.Arg1765Gln); rs 142546324; gnomAD 1.74x10-4; CV 161316 VOUS; Gerp 4.7; VarSome VOUS (PM2, PP3); InSilico 15/17; OMIM #132900 Aortic aneurysm, familial thoracic 4, AD	VOUS (PM2, PP3, BP6)	Likely Pathogenic (PM5, PP3, PM2, PP5)		
M	54527	Brez odstopanj.				
M	54526	Brez odstopanj.				
M	54525	Brez odstopanj (kardio); Patogena različica v genu CREB3L3:c.732dup, ki je značilna za Hipertrofičnemijo 2, AD.	Likely pathogenic (PM51, PP5, BS1)	VOUS (PM2, BP1)	Povišani trigliceridi	

M	54524	Brez odstopanj.		
M	54523	Brez odstopanj.		
Ž	VZA	TTN 2-179430380-T het insertion; rs / ; TTN(NM_001267550.2):c.80478dupA (p.Trp2827MetfsTer6); CV / ; gerp 5,48; gnomAD / ; inSilico / ; Cardio Class psNV (PVS1, PM2); VarSome psNV PVS1,PM2, PP3; OMIM #186840 (CMP_AD)	Pathogenic (PVS1, PM2, PP3)	
M	VIV	Brez odstopanj.		
Ž	57627	Brez odstopanj.		
M	57612	Brez odstopanj.		
M	58035	Brez odstopanj.		
M	58036	Brez odstopanj.		
M	58037	Brez odstopanj.		
M	58038	HCN4 15-73624512-T-A het missense; rs 1444329166; HCN4(NM_005477.3):c.1331A>T (p.Asp444Val); CV 1349052 (VOUS) ; gerp 4,63; gnomAD / ; inSilico P (13/23); Cardio Class / ; VarSome VOUS (PM2, PP3, BP1); Franklin VOUS (PM2, PP3) OMIM #605206 (Brugada Sy. 8, AD; Sick sinus sy. 2, AD)	VOUS (PM2, PP3)	VOUS (PM2, PP3, BP1)
M	58039	Brez odstopanj.		
M	58040	Brez odstopanj.		
M	58041	Brez odstopanj.		
M	58042	Brez odstopanj.		
M	58043	KCNQ1 11-2466656-G-A het missense; rs199472677; KCNQ1(NM_000218.3):c.328G>A (p.Val110Ile); CV53034 VOUS ; gerp3,03; gnomAD: 6,26x10-5; inSilico P (6/25); Cardio Class: VOUS (PP2); VarSome VOUS (PM1, PM2); Franklin VOUS (PM1, PM2, PP2) OMIM #607542	VOUS (PM1, PM2, PP2)	VOUS (PM1, PM2)
M	58044	Brez odstopanj.		
M	58045	Brez odstopanj.		
M	58046	Brez odstopanj.		
M	58047	Brez odstopanj.		
M	58048	Brez odstopanj.		
M	58049	GCKR 2-27745372-C-T het stop gained; rs146053779; GCKR(NM_001486.4):c.1618C>T (p.Arg540Ter); CV1189882 VOUS ; gerp3,83; gnomAD: 9,63x10-4; inSilico VOUS (2/10); Cardio Class / ; VarSome VOUS (PM2); Franklin LP [PVS1, PM2] OMIM #600842	Likely Pathogenic (PVS1, PM2)	VOUS (PM2)

Povišana glukoza