

# Genetsko testiranje u dijagnostici kardiomiopatija

---

Galić, Stjepan

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:340479>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-07**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**

**MEDICINSKI FAKULTET**

**Stjepan Galić**

**Genetsko testiranje u dijagnostici  
kardiomiopatija**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2024.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za bolesti srca i krvnih žila Kliničke bolnice Dubrava Zagreb, pod vodstvom doc.dr.sc. Marija Udovičića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2023./2024.

## **Popis oznaka i kratica korištenih u radu**

ACM – aritmogena kardiomiopatija (engl. arrhythmogenic cardiomyopathy)

ACMG – Američki koledž medicinske genetike (engl. American College of Medical Genetics)

ACTC1 –  $\alpha$ -aktin 1 (engl. actin alpha cardiac muscle 1)

ACTN2 -  $\alpha$ -aktinin 2 (engl. alpha actinin 2)

AHA – Američka udruga za srce (engl. American Heart Association)

AL – amiloidni laki lanac (engl. amyloid light-chain)

ALVC – aritmogena kardiomiopatija lijeve klijetke (engl. arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy)

ARVC – aritmogena kardiomiopatija desne klijetke (engl. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopath)

ATP – adenzin trifosfat (engl. adenosine triphosphate)

ATTR – amiloidni transtiretin (engl. amyloid transthyretin)

CDH2 – kadherin 2 (engl. cadherin 2)

CLOE – engl. consensus level of evidence

CSRP3 – protein 3 bogat cisteinom i glicinom (engl. cysteine and glycine rich protein 3)

DCM – dilatativna kardiomiopatija (engl. dilated cardiomyopathy)

DMD – distrofin (engl. dystrophin)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. deoxyribonucleic acid)

DSC2 – dezmokolin 2 (engl. desmocollin 2)

DSG2 – dezmoglein 2 (engl. desmoglein 2)

DSP – dezmoplakin (engl. desmoplakin)

EKG – elektrokardiografija

ESC – Europsko kardiološko društvo (engl. European Society of Cardiology)

FHL1 – protein četiri i pol LIM domene 1 (engl. four and a half LIM domain protein 1)

FLNC – filamin C (engl. filamin C)

GenCC – Gene Curation Coalition

HCM – hipertrofijska kardiomiopatija (engl. hypertrophic cardiomyopathy)

JPH2 – junktofilin 2 (engl. junctophilin 2)

LVNC – nekompaktna lijeva klijetka (engl. left ventricular non-compaction)

LVOT – opstrukcija izlaznog trakta lijeve klijetke (engl. left ventricular outflow tract)

MYBPC3 – kardijalni protein C koji veže miozin (engl. myosin-binding protein C)

MYH6 – teški lanac  $\beta$ -miozina 6 (engl. myosin heavy chain 6)

MYH7 – teški lanac  $\beta$ -miozina 7 (engl. myosin heavy chain 7)

MYL2 – miozin laki lanac 2 (engl. myosin light chain 2)

MYL3 – miozin laki lanac 3 (engl. myosin light chain 3)

MYOM2 – miomezin 2 (engl. myomesin 2)

MYOZ2 – miozenin 2 (engl. myozenin 2)

NDLVC – ne dilatativa kardiomiopatija lijeve klijetke (engl. non-dilated left ventricular cardiomyopathy)

NGS – sekvenciranje nove generacije (engl. next-generation sequencing)

NIH – nacionalni institut za zdravlje (engl. National Institutes of Health)

NYHA – Njujorsko kardiološko društvo (engl. New York Heart Association)

OBSCN – opskurin (engl. obscurin)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. polymerase chain reaction)

PKP2 – plakofilin 2 (engl. plakophilin 2)

PLN – fosfolamban (engl. phospholamban)

RCM – restriktivna kardiomiopatija (engl. restrictive cardiomyopathy)

SBL – sekvenciranje ligacijom (engl. sequencing by ligation)

SBS – sekvenciranje sintezom (engl. sequencing by synthesis)

SCD – iznenadna srčana smrt (engl. sudden cardiac death)

SCN5A – alfa podjedinica natrijskog kanala Nav 1.5 (engl. sodium channel protein type 5 subunit alpha)

SERCA2a – kalcij-ATP-aza 2 u sarkoplazmatskom retikulumu (engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase 2)

SMRT – sekvenciranje molekula u stvarnom vremenu (engl. single-molecule real time sequencing)

TCAP – teletonin (engl. telethonin)

TNNC1 – troponin C1

TNNI3 – troponin I3

TNNT2 – troponin T2

TPM1 – tropomiozin 1

TRIM63 – trodijelni motiv koji sadrži 63 (engl. tripartite motif containing 63)

TTN – titin

VUS – varijanta nepoznatog/nejasnog kliničkog značenja (engl. variant of unknown significance)

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

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

## SADRŽAJ

### SAŽETAK

### SUMMARY

1. UVOD .....	1
2. KARDIOMIOPATIJE: DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA .....	2
2.1. GENETSKA PODLOGA KARDIOMIOPATIJA I PREPORUKE EUROPSKOG KARDIOLOŠKOG DRUŠTVA .....	4
3. NASLJEDNE KARDIOMIOPATIJE .....	9
3.1. HIPERTROFIJSKA KARDIOMIOPATIJA (HCM) .....	9
3.1.1. OSNOVE I MEHANIZMI .....	9
3.1.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE HCM .....	11
3.2. ARITMOGENA KARDIOMIOPATIJA (ACM) .....	12
3.2.1. OSNOVE I MEHANIZMI .....	13
3.2.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE ACM .....	13
3.3. DILATATIVNA KARDIOMIOPATIJA (DCM) .....	14
3.3.1. OSNOVE I MEHANIZMI .....	14
3.3.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE DCM .....	15
3.4. RESTRIKTIVNA KARDIOMIOPATIJA (RCM) .....	16
3.4.1. OSNOVE I MEHANIZMI .....	16
3.4.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE RCM .....	17
4. METODE GENETSKOG TESTIRANJA U DIJAGNOSTICI KARDIOMIOPATIJA .....	18
4.1. METODOLOGIJA GENETSKOG TESTIRANJA .....	18
4.2. KLASIFIKACIJA GENA I VARIJANTI .....	23
4.3. NALAZ GENETSKOG TESTIRANJA .....	25
5. KLINIČKI ASPEKTI GENETSKOG TESTIRANJA U KARDIOMIOPATIJAMA .....	27
5.1. GENETSKI PROBIR .....	27

5.2. INTERPRETACIJA NALAZA .....	28
5.3. GENETSKO SAVJETOVANJE .....	29
5.4. KASKADNO OBITELJSKO TESTIRANJE .....	31
5.5. KORISTI GENETSKOG TESTIRANJA .....	32
6. ETIČKI I PRAVNI ASPEKTI GENETSKOG TESTIRANJA U DIJAGNOSTICI KARDIOMIOPATIJA .....	34
7. ZAKLJUČAK.....	35
8. ZAHVALE.....	36
9. LITERATURA .....	37
10. ŽIVOTOPIS.....	44



## **SAŽETAK**

**NASLOV: GENETSKO TESTIRANJE U DIJAGNOSTICI KARDIOMIOPATIJA**

**AUTOR: STJEPAN GALIĆ**

Kardiomiopatije su bolesti miokarda karakterizirane strukturalnim i funkcionalnim poremećajem srčanog mišića sa složenom etiopatogenezom. Mogu dovesti do razvoja akutnog i kroničnog srčanog zatajivanja, malignih aritmija, formacije tromba i tromboembolijskih incidenata i iznenadne srčane smrti. Unatoč opsežnim naporima medicinske zajednice, klasifikacija kardiomiopatija i dalje je problematična zbog značajnog fenotipskog i genotipskog preklapanja između različitih oblika bolesti. Tradicionalno ih dijelimo na hipertrofijsku, dilatativnu i restriktivnu kardiomiopatiju. Jonathan i Christine Seidman 1990. otkrili su prvu mutaciju u MYH7 genu povezanu s razvojem hipertrofijske kardiomiopatije (HCM), čime je započelo istraživanje složene genetske osnove kardiomiopatija. Dugo godina analiza genetske podloge kardiomiopatija bila je ograničena skupocjenim i vremenski iscrpnim metodama. Otkrićem sekvenciranja nove generacije (NGS) omogućeno je brže, jeftinije i opsežnije testiranje. Genetsko ispitivanje provodi se kod pacijenata s potvrđenom dijagnozom, sumnjom na bolest te u članova obitelji i krvnih srodnika pacijenata s dokazanom uzročnom mutacijom. Ovakvo ispitivanje omogućuje potvrdu dijagnoze, otkrivanje bolesti u ranoj fazi, promjenu tijeka bolesti, prepoznavanje bolesti u krvnih srodnika i članova obitelji te primjenu ciljane terapije. Ovakva praksa nosi s sobom i brojne etičke dileme, uključujući psihološki utjecaj na pacijente, obiteljske implikacije te zaštitu prava i privatnosti pacijenata. Implementacija genetskog testiranja u svakodnevnu kliničku praksu s vremenom će postati standard, a uz razvoj dijagnostičkih algoritama omogućit će ranije postavljanje dijagnoze, procjenu rizika i informiranje pacijenata i krvnih srodnika o zdravstvenom stanju.

**Ključne riječi:** genetsko testiranje; kardiomiopatije; sekvenciranje nove generacije

## **SUMMARY**

**TITLE: GENETIC TESTING IN DIAGNOSTICS OF CARDIOMYOPATHIES**

**AUTHOR: STJEPAN GALIĆ**

Cardiomyopathies are myocardial diseases characterized by structural and functional abnormalities of the heart muscle with complex etiopathogenesis. They can lead to the development of acute and chronic heart failure, malignant arrhythmias, the formation of thrombus and thromboembolic events, and sudden cardiac death. Despite extensive efforts of the medical community, cardiomyopathies are still very difficult to classify due to significant phenotypic and genotypic overlap between different forms of the disease. Traditionally, they are classified into hypertrophic, dilated, and restrictive cardiomyopathy. In 1990, Jonathan and Christine Seidman discovered the first mutation in the MYH7 gene associated with the development of hypertrophic cardiomyopathy (HCM), marking the beginning of research into the complex genetic basis of cardiomyopathies. For many years, the analysis of the genetic background of these diseases was limited by expensive and time-consuming methods. The discovery of next-generation sequencing (NGS) has enabled faster, cheaper, and more extensive testing. Genetic testing is conducted in patients with a confirmed diagnosis, those suspected of having the disease, and family members and relatives of patients with a proven causal mutation. This testing allows for the confirmation of diagnoses, early disease detection, alteration of disease progression, identification of the disease in relatives, and application of targeted therapy. Such practices carry numerous ethical dilemmas, including the psychological impact on patients, family implications, and protecting patients' rights and privacy. The implementation of genetic testing in everyday clinical practice will gradually become standard. With the development of diagnostic algorithms, it will enable earlier diagnosis, risk assessment, and the informing of patients and their relatives about their health condition.

Keywords: genetic testing; cardiomyopathies; next-generation sequencing

## 1. UVOD

Kardiomiopatije su bolesti miokarda karakterizirane strukturalnim i funkcionalnim nepravilnostima srčanog mišića koje se javljaju u odsustvu koronarne arterijske bolesti, arterijske hipertenzije, valvularne bolesti i kongenitalne srčane bolesti (1). Ove bolesti mogu dovesti do razvoja akutnog ili kroničnog srčanog zatajivanja, malignih aritmija, formiranja tromba i tromboembolijskih incidenata, patologije zalistaka i iznenadne srčane smrti. U svakodnevnoj kliničkoj praksi, dijagnoza se obično postavlja na temelju kliničke slike, anamnestičkih podataka, laboratorijskih nalaza, elektrokardiografskog (EKG) i ehokardiografskog nalaza. Unatoč naporima medicinske zajednice, kardiomiopatije je i dalje teško klasificirati na temelju zajedničkih karakteristika. Jonathan i Christine Seidman otkrili su 1990. godine prvu mutaciju u MYH7 genu, koja je važna za funkciju sarkomere, te su je povezali je razvojem hipertrofijske kardiomiopatije (HCM) (2). Njihovo otkriće označilo je početak istraživanja složenih i kompleksnih mehanizama putem kojih genske mutacije dovode do razvoja kardiomiopatija. Dugo vremena, pronalazak ciljanih uzročnih mutacija i sekvenciranje čitavog genoma bilo je otežano vremenskim i financijskim ograničenjima tehnologije koja se koristila. Otkrićem sekvenciranja nove generacije (engl. next-generation sequencing; NGS) započela je nova era molekularne kardiologije, omogućujući kliničarima i znanstvenicima dublje razumijevanje nasljednih srčanih bolesti. S obzirom na veliku količinu genetskih informacija, osim pronalaska ciljnih gena i patogenih varijanti odgovornih za nastanak bolesti, često se otkrivaju i varijante nepoznatog ili nejasnog kliničkog značenja (engl. variant of unknown significance; VUS).

## 2. KARDIOMIOPATIJE: DEFINICIJA I KLASIFIKACIJA

Kardiomiopatije su velika i heterogena skupina bolesti koje zahvaćaju miokard i dovode do morfoloških i funkcionalnih poremećaja srčanog mišića. Glavna značajka svih kardiomiopatija je mehanička i/ili električna disfunkcija koja dovodi do ventrikularne hipertrofije ili dilatacije i često rezultira progresivnim srčanim zatajivanjem i smrtnim ishodom (3). Mnoge su predložene klasifikacije kardiomiopatija kontradiktorne i zbunjujuće, unatoč naporima svjetskih stručnjaka da ih klasificiraju na temelju zajedničkih obilježja (anatomska, morfološka, funkcionalna, klinička) radi olakšavanja dijagnostičkog i terapijskog pristupa.

Koristeći osnovna morfološka obilježja i funkcionalne promjene u radu srčanog mišića kardiomiopatije tradicionalno dijelimo na hipertrofijsku (engl. hypertrophic cardiomyopathy; HCM), dilatativnu (engl. dilated cardiomyopathy; DCM) i restriktivnu (engl. restrictive cardiomyopathy; RCM) kardiomiopatiju. Međutim, ova klasifikacija je problematična jer se fenotipski oblici često preklapaju, te može biti teško odrediti kojoj kategoriji bolesnik pripada. Također, miješa se anatomsku terminologiju (hipertrofija, dilatacija) s funkcionalnom (restriktivna).

Definicija Američke udruge za srce (engl. American Heart Association; AHA) iz 2006. godine dijeli kardiomiopatije u dvije velike grupe: primarne kardiomiopatije (ograničene na srce) i sekundarne kardiomiopatije, odnosno kardiomiopatije koje su dio širih sistemskih bolesti. Primarne kardiomiopatije se dalje dijele na genetske, miješane (genetske i negenetske) i stečene (3). Elliott P i sur. ističu kako primarne kardiomiopatije često imaju značajne ekstrakardijalne manifestacije, dok sistemske bolesti sa zahvaćanjem miokarda, koje spadaju u kategoriju sekundarnih kardiomiopatija, mogu predominantno zahvaćati srce, što dovodi do značajnog preklapanja između ovih kategorija (1).

Europsko kardiološko društvo (engl. European Society of Cardiology; ESC) 2008. godine predložilo je klasifikaciju kardiomiopatija temeljenu na kliničkim fenotipskim karakteristikama:

DCM, HCM, RCM, aritmogena kardiomiopatija desne klijetke (engl. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; ARVC) i ostale. Kardiomiopatije se zatim mogu dodatno svrstati u familijalne i nefamilijalne, gdje familijalna kardiomiopatija podrazumijeva prisutnost bolesti u više od jednog člana obitelji ili fenotip uzrokovan istom genetskom mutacijom. Nefamilijalna kardiomiopatija pojavljuje se u odsutnosti pozitivne obiteljske anamneze te može biti idiopatska ili stečena (1).

Arbustini E i sur. 2012. predlažu MOGE(S) klasifikaciju, koja se temelji na TNM klasifikaciji tumora. Ova klasifikacija pridodaje 5 osnovnih svojstava svakom kardiomiopatskom poremećaju: morfofunkcionalna obilježja (M), uključenost organa (O), nasljedni obrazac (G), etiološka svojstva (E) i informacije o funkcionalnom statusu (S), koje se procjenjuju uz pomoć ACC/AHA klasifikacije ili funkcionalne klasifikacije Njujorškog kardiološkog društva (engl. New York Heart Association; NYHA). Arbustinijev pristup klasificiranju sveobuhvatan je te pomaže prilagodbi i usmjerenju strategije liječenja bolesti (4). Salem VMC i sur. ukazuju na određena ograničenja MOGE(S) klasifikacije, kao što su odsutnost tahikardiomiopatija, kardiomiopatija vezanih uz endokrine bolesti i peripartalne kardiomiopatije (5). Iako je MOGE(S) klasifikacija sveobuhvatna, zahtijeva dodatne resurse koji mogu značajno povećati troškove i produžiti vrijeme od postavljanja dijagnoze do liječenja pacijenta.

Razvojem NGS-a genetika ima sve veću ulogu u razumijevanju mehanizama kardiomiopatija i otkrivanju ciljanih mutacija gena. Za kliničke potrebe u genetskom testiranju koristi se podjela kardiomiopatija po smjernicama ESC iz 2023. godine. Smjernice ESC preporučuju podjelu kardiomiopatija na temelju fenotipskog oblika bolesti koji dominira, uzimajući u obzir da u pacijenata može postojati više oblika istovremeno te se jedan oblik progresijom bolesti može razviti u drugi (6). ESC prepoznaje kako kodirajući geni za kardijalne ionske kanale mogu biti involvirani u razvoju DCM, bolesti provođenja i aritmija, ali smatra kako za sada još nema dovoljno dokaza kako bi se kardijalne kanalopatije smatrale vrstom kardiomiopatija (6). ESC dijeli kardiomiopatije na: HCM, DCM, ne dilatativnu kardiomiopatiju lijevog ventrikula (engl. non-

dilated left ventricular cardiomyopathy; NDLVC), ARVC i RCM (6). ARVC se danas smatra podtipom aritmogene kardiomiopatije (engl. arrhythmogenic cardiomyopathy; ACM) gdje još spadaju i aritmogena kardiomiopatija lijeve klijetke (engl. arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy; ARVC), lijeva i desno dominantna kardiomiopatija i aritmogena dilatativna kardiomiopatija (6).

## **2.1. GENETSKA PODLOGA KARDIOMIOPATIJA I PREPORUKE EUROPSKOG KARDIOLOŠKOG DRUŠTVA**

Obiteljski oblici kardiomiopatija pokazuju različite načine nasljeđivanja. Do sada smo većinom bili usredotočeni na identifikaciju gena Mendelove (monogene) bolesti koji najčešće pokazuju autosomno-dominantno nasljeđivanje, iako se također opisuju i drugi obrasci nasljeđivanja: autosomno-recesivno, X-vezano i mitohondrijsko (6).

Kardiomiopatije općenito karakterizira određeni stupanj genetske i alelne heterogenosti, što znači da dok mnoge varijante u pojedinim genima mogu uzrokovati isti fenotip, česti su i fenomeni nepotpune penetracije kao i varijabilna ekspresija. Isto tako mutacije pojedinog gena mogu se manifestirati i različitim fenotipovima (7).

Ova varijabilnost mogla bi biti uslijed heterogenosti uzročnih varijanti, utjecaja negenetskih ili epigenetskih (kliničkih, okolišnih) čimbenika, kao i nasljeđivanja dodatnih genetskih čimbenika, koji mogu amplificirati ili oslabiti učinak glavne genetske varijante na fenotip (8).

Udio slučajeva s pouzdanom genetskom etiologijom (odnosno s prepoznavanjem vjerojatne uzročne Mendelove genetske varijante) među kardiomiopatijama je danas još uvijek relativno nizak (npr. samo 30-40 % u HCM i DCM) (Tablica 1) (9).

Tablica 1. NGS dijagnostički prinos i broj gena impliciran prema bazi ClinGen za pojedini fenotip kardiomiopatije (9)

Bolest	Prevalencija	Dijagnostički prinos	Funkcije glavnih gena	Broj gena prema ClinGen	Reference
HCM	1:200	40-72 %	sarkomere, ovojnica jezgre	28	(10)
DCM	1:2,500	8-25 % u sporadičnih DCM, 30-40 % u obiteljskih DCM	citoskelet, sarkomere, ovojnica jezgre, dezmosomi (DCM + HCM + ARVC geni)	42	(11, 12)
ARVC	1:5,000	10-50 %	dezmosomi, homeostaza kalcija, sarkomere, ovojnica jezgre, intermedijarni filamenti, ionski kanali	17	(13)
RCM	<1/10,00,000	10-60 %	sarkomere citoskelet, Z-disk (HCM+ DCM+ LVNC, +ACM geni)	-	(13-15)
LVNC	<1/10,00,000	10-50 %	razno (HCM+ DCM+ LVNC, +ACM geni)	-	(13)

Sve se više zna i o značajnoj komponenti poligenetskog nasljeđivanja u kardiomiopatijama. Suprotno Mendelovskom nasljeđivanju, gdje se jedna varijanta s velikim učinkom manifestira kao poremećaj, kombinirano nasljeđe počiva na nasljeđivanju višestrukih varijanti pojedinih gena s kumulativnim učinkom (16).

Stoga se smatra da obrazac genetskog nasljeđivanja kardiomiopatija predstavlja kontinuum složenosti, s mendelskim oblicima na jednom kraju, gdje jedna varijanta ima veliki učinak (jedan gen – jedan fenotip), i poligenim oblicima nasljeđivanja na drugom (6).

Genetsko testiranje gena za kardiomiopatije s Mendelovskim nasljeđivanjem postalo je standardni dio kliničke prakse (6, 17), što je i prepoznato u smjernicama ESC iz 2023.

Testiranje prve linije trebalo bi biti usmjereno na gene koji su čvrsto povezani s prisutnim fenotipom. Ako se utvrdi genetski uzrok kod jednog člana obitelji, tada se drugi članovi obitelji mogu podvrgnuti testiranju samo na uzročnu varijantu.

Genetsko testiranje kod pojedinca s kardiomiopatijom (poznato kao potvrdno testiranje ili dijagnostičko testiranje) preporučuje se za potvrdu dijagnoze, prognozu tijeka bolesti, eventualnog odabira liječenja i odluke o planiranju potomstva. Genetsko testiranje mora uvijek biti popraćeno genetskim savjetovanjem, prije, za vrijeme i poslije testiranja. To je proces koji ima za cilj podržati pacijente i njihove obitelji u prilagodbi medicinskim, psihosocijalnim i obiteljskim implikacijama dijagnoze genetskih bolesti (6).

Tablica 2. Preporuke ESC za genetsko savjetovanje i testiranje kod bolesnika s kardiomiopatijama iz 2023. (6)

Preporuke	Razred	Razina
<b>Genetsko savjetovanje</b>		
Genetsko savjetovanje, koje provodi odgovarajuće educirani zdravstveni stručnjak i uključuje genetsku edukaciju za informirano donošenje odluka te psihosocijalnu podršku, preporučuje se za obitelji s nasljednom ili sumnjivom nasljednom kardiomiopatijom, bez obzira na to razmatra li se genetsko testiranje.	I	B
Preporučuje se da se genetsko testiranje za kardiomiopatiju provodi uz pristup multidisciplinarnog tima, koji uključuje stručnjake za metodologiju genetskog testiranja, interpretaciju sekvencijskih varijanti i kliničku primjenu genetskog testiranja, obično u sklopu specijaliziranog tima za kardiomiopatije ili u umreženom modelu s mogućnosti pristupa odgovarajućoj ekspertizi.	I	B
Preporučuje se genetsko savjetovanje prije i poslije testiranja svih osoba koje prolaze genetsko testiranje na kardiomiopatije.	I	B



Ako obitelj namjerava provesti prenatalno dijagnostičko testiranje, preporučuje se da se to obavi rano tijekom trudnoće kako bi se omogućilo donošenje odluka o nastavku ili koordinaciji trudnoće.	I	C
Razgovor o mogućnostima reproduktivnog genetskog testiranja s odgovarajuće obučanim zdravstvenim stručnjakom trebao bi se razmotriti za sve obitelji s genetskom dijagnozom.	IIa	C
<b>Indeksni bolesnici</b>		
Preporučuje se genetsko testiranje kod pacijenata koji ispunjavaju dijagnostičke kriterije za kardiomiopatiju u slučajevima kada isto omogućava dijagnozu, prognozu, terapijsku stratifikaciju ili upravljanje reproduktivnim zdravljem pacijenta, ili kada pak omogućava kaskadnu genetsku evaluaciju njihovih rođaka koji bi inače bili uključeni u dugoročno praćenje.	I	B
Preporučuje se genetsko testiranje za preminulu osobu identificiranu s kardiomiopatijom na post-mortem pregledu ako bi genetska dijagnoza koristila u obradi preživjelih članova obitelji.	I	C
Genetsko testiranje se može razmotriti kod pacijenata koji ispunjavaju dijagnostičke kriterije za kardiomiopatiju kada postoji ukupna korist za pacijenta, uzimajući u obzir psihološki utjecaj i preferencije, čak i onda ako ne omogućava dijagnozu, prognozu ili terapijsku stratifikaciju, niti kaskadno genetsko testiranje njihovih rođaka.	IIb	C
Genetsko testiranje kod pacijenata s graničnim fenotipom, koji ne ispunjavaju dijagnostičke kriterije za kardiomiopatiju može se razmotriti tek nakon detaljne procjene od strane specijalističkog konzilija.	IIb	C
<b>Članovi obitelji</b>		
Preporučuje se da se kaskadno genetsko testiranje, uz savjetovanje prije i poslije testiranja, ponudi rizičnim odraslim srođnicima ako je kod osobe s kardiomiopatijom u obitelji uspostavljena sigurna genetska dijagnoza (tj. varijanta s vjerojatnom ili dokazanom patogenošću), počevši s rođacima prvog stupnja ako su dostupni, i nastavljajući tako sekvencijalno prema dalje.	I	B

<p>Kaskadno genetsko testiranje s prethodnim i naknadnim savjetovanjem trebalo bi se razmotriti kod rizičnih pedijatrijskih srodnika ako je postavljena sigurna genetska dijagnoza (tj. varijanta s vjerojatnom ili dokazanom patogenošću) kod osobe s kardiomiopatijom u obitelji (počevši s rođacima prvog stupnja, ako su dostupni, i nastavljajući sekvencijalno), uzimajući u obzir kardiomiopatiju, očekivanu dob manifestacije, prezentaciju u obitelji te kliničke/pravne posljedice.</p>	<b>IIa</b>	<b>B</b>
<p>Testiranje na prisutnost obiteljske varijante nepoznatog značaja, obično kod roditelja i/ili pogođenih rođaka, kako bi se utvrdilo segregira li varijanta s fenotipom kardiomiopatije, trebalo bi se razmotriti ako bi to moglo omogućiti pouzdanu interpretaciju varijante.</p>	<b>IIa</b>	<b>C</b>
<p>Genetsko dijagnostičko testiranje nije preporučljivo kod rođaka s negativnim fenotipom pacijenta s kardiomiopatijom, a u odsutnosti sigurne genetske dijagnoze (tj. varijante s vjerojatnom ili dokazanom patogenošću) u obitelji.</p>	<b>III</b>	<b>C</b>

### **3. NASLJEDNE KARDIOMIOPATIJE**

Nasljedne kardiomiopatije možemo podijeliti na HCM, DCM, RCM, nekompaktnu lijevu klijetku (engl. left ventricular non-compaction; LVNC) i ARVC. Familijalne kardiomiopatije često imaju značajna genotipska preklapanja, koja iz još nedovoljno poznatih razloga dovode do različitog fenotipskog oblika bolesti.

#### **3.1. HIPERTROFIJSKA KARDIOMIOPATIJA (HCM)**

HCM najčešća je nasljedna kardiovaskularna bolest. Prevalencija u općoj populaciji iznosi 1:500 (18). HCM na temelju ESC smjernica iz 2014. definiramo kao zadebljanje stijenke lijevog ventrikula  $\geq 15$  mm koje se ne može objasniti isključivo poremećajem u volumnom ili tlačnom opterećenju (19).

##### **3.1.1. OSNOVE I MEHANIZMI**

Patofiziološki slijed događaja u razvoju HCM možemo podijeliti u 4 skupine međusobno povezanih promjena. Mjesto primarnog poremećaja (uzročna mutacija gena), inicijalni odnosno proksimalni poremećaji (promjene na razini transkripcije mRNA, ekspresije proteina, osjetljivosti na kalcij i aktivnosti adenosin trifosfata (engl. adenosine triphosphate; ATP), sekundarne odnosno intermedijarne molekularne promjene (signalni putevi, genska ekspresija, posttranslacijske modifikacije proteina, mitohondrijska disfunkcija, trofički i mitotički čimbenici), tercijarne histološke fenotipove (hipertrofija kardiomiocita, dezorganizacija kardiomiocita, intersticijska fibroza i hipertrofija lijeve klijetke) i kvartarne kliničke fenotipove (kardijalne aritmije, iznenadna srčana smrt (engl. sudden cardiac death; SCD), opstrukcija izlaznog trakta lijeve klijetke (engl. left ventricular outflow tract; LVOT), srčano zatajivanje) (20).

U razvoju HCM dolazi do povećane osjetljivosti na kalcij i pojačane proizvodnje sile (21). HCM nasljeđuje se autosomno-dominantnim obrascem nasljeđivanja, gdje obično postoji jedan uzročni gen odgovoran za razvoj bolesti s 50 % rizikom od prijenosa na potomke uz varijabilnu penetrantnost i ekspresivnost (22). Pacijenti s familijalnim oblikom HCM ranije razvijaju jasnu kliničku sliku, imaju veću prevalenciju iznenadne srčane smrti, jasnije izraženu hipertrofiju, mikrovaskularnu disfunkciju, miokardijalnu fibrozu i lošiju prognozu od sporadične HCM (22).

Christine Seidman i Jonathan Seidman 1990. identificirali su točkastu missense mutaciju p.Arg403Glu (p.R403Q) u MYH7 genu odgovornom za sintezu MYH7 proteina ključnog u funkciji sarkomere i tako otkrili prvu mutaciju odgovornu za razvoj HCM (21).

Teški lanac  $\beta$ -miozina 7 (engl. myosin heavy chain 7; MYH7) glavna je komponenta mišićne motorne molekule koja sudjeluje u mišićnoj kontrakciji, heksamerni kompleks sastavljen od dvije MYH7, dva laka lanca miozina 2 (engl. myosin light chain 2; MYL2) i dva laka lanca miozina 3 (engl. myosin light chain 3; MYL3) koje reagiraju sa zglobnom regijom MYH7 proteina te vrše hidrolizu ATP-a u ADP. Kardijalni protein C koji veže miozin (engl. myosin-binding protein C; MYBPC3) veže se uz MYH7 i srčani aktin te regulira međudjelovanje aktina i miozina. Titin (TTN) se pruža između M i Z linije te stabilizira debele filamente i sprječava prenaprezanje sarkomere te sarkomeru poput opruge vraća u početni položaj nakon kontrakcije. Teški lanac  $\beta$ -miozina 6 (engl. myosin heavy chain; MYH6) izoforma je MYH7 te čini manje od 10% ukupnog MYH proteina u kardiomiocitima (23).

Tanki filament polimer je sastavljen od  $\alpha$ -aktina 1 (engl. actin alpha cardiac muscle 1; ACTC1) i troponinsko/tropomiozinskog kompleksa kojeg formiraju srčani troponin C1 (engl. troponin C1; TNNC1), srčani troponin I (engl. troponin I3; TNNI3) i srčani troponin T (engl. troponin T2; TNNT2). TNNC1 veže kalcij, TNNI3 djeluje kao inhibitorna komponenta, a TNNT2 usidruje troponinski kompleks za tropomiozin 1 (engl. tropomyosin 1; TPM1) (23).

Z-linija djeluje kao sidro za koje se vežu krajevi tankih filamenata i omogućuju mehaničku stabilnost za vrijeme mišićne kontrakcije i relaksacije, građena je od velikog broja proteina kao što su  $\alpha$ -aktinin 2 (engl. alpha-actinin 2; ACTN2), miozenin 2 (engl. myozenin 2; MYOZ2), protein 3 bogat cisteinom i glicinom (engl. cysteine and glycine rich protein 3; CSRP3), teletonin (engl. telethonin; TCAP) i protein četiri i pol LIM domene 1 (engl. four and a half LIM domain protein 1; FHL1) (23).

M-linija nalazi se u sredini sarkomere i usidruje debele filamente, značajni proteini u građi su opskurin (engl. obscurin; OBSCN), miomezin 2 (engl. myomesin 2; MYOM2) i trodijelni motiv koji sadrži 63 (engl. tripartite motif containing 63; TRIM63). Junktofilin 2 (engl. junctophilin 2; JPH2) važna je proteinska komponenta junkcijskog membranskog kompleksa koji regulira homeostazu kalcija, a fosfolamban (engl. phospholamban; PLN) djeluje kao regulator homeostaze kalcija putem inhibicije kalcij-ATP-aze 2 u sarkoplazmatskom retikulumu (engl. sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium-ATPase; SERCA2a) (24).

Genetske mutacije odgovorne za razvoj HCM možemo podijeliti na temelju uloge zahvaćenog proteina u građi sarkomere te prema tome postoje: geni koji kodiraju proteinske sastavnice debelog filameta (MYH7, MYBPC3, MYL2, MYL3, TTN, i MYH6), geni koji kodiraju proteinske sastavnice tankog filameta (TNNT2, TNNI3, TNNC1, TPM1 i ACTC1), geni koji kodiraju proteinske sastavnice Z linije (MYOZ2, ACTN2, CSRP3, TCAP i FHL 1), geni koji kodiraju proteinske sastavnice M linije (OBSCN, TRIM63, MYOM2), geni odgovorne za regulaciju homeostaze kalcija u srčanom mišiću (JPH2 i PLN) i geni koji kodiraju proteine neizravno vezane za regulaciju strukture sarkomere (FLNC, ALPK3, CAV3 i CRYAB) (24).

### **3.1.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE HCM**

U više od polovine slučajeva HCM se nasljeđuje po Mendelovskom principu nasljeđivanja. Sporadični slučajevi mogu imati monogeniski obrazac nasljeđivanja ako se radi o naslijeđenoj

varijanti nekompletne penetrantnosti, de novo mutaciji ili autosomno-recesivno naslijeđenom genu. Vjerojatnost pronalaska uzročnog gena najveća je u mladim pacijenata, a najmanja u starijih bolesnika i pacijenata s atipičnom kliničkom slikom (6).

Genetsko testiranje pacijenata preporučuje se pacijentima koji imaju jasnu kliničku dijagnozu HCM, te bi otkriće genske mutacije odgovorne za razvoj bolesti koristilo članovima obitelji. To uključuje (a) obitelji s pozitivnom anamnezom na SCD; (b) obitelji s članovima pod rizikom koji i inače zahtijevaju kliničku procjenu; i (c) obitelji u kojima postoji teška klinička slika, uključujući pojedince koji imaju teške komplikacije HCM unatoč blagoj hipertrofiji (25). Metoda redoslijednog probira članova obitelji ima značajniju ulogu nego klinički probir uz pomoć EKG-a, ehokardiografije i sličnih metoda, jer u trenutku pregleda promjene mogu biti nezamjetljive te se bolest može razviti kasnije u životu (25). Dijagnostički prinos u testiranju na HCM u osoba s postavljenom kliničkom dijagnozom iznosi između 30-40 % te ovisi o nizu čimbenika kao što su dob i pozitivna obiteljska anamneza (26).

### **3.2. ARITMOGENA KARDIOMIOPATIJA (ACM)**

ARVC definirana je prisutnošću dilatacije desnog ventrikula i/ili disfunkcije uz prisutnost karakterističnih histoloških promjena (propadanje kardiomiocita i zamjena vezivno-masnim tkivom) i/ili elektrokardiografski poremećaji koja se klinički prezentira malignim ventrikularnim aritmijama i značajnom bolešću desne klijetke. Nove spoznaje proširile su saznanja te u terminologiju uključile i aritmogenu kardiomiopatiju lijeve klijetke (engl. arrhythmogenic left ventricular cardiomyopathy; ALVC), lijevu i desnu dominantnu kardiomiopatiju te aritmogenu dilatativnu kardiomiopatiju koje su zajedničkim nazivom sa ARVC svrstane u kategoriju ACM (6). Prevalencija ARVC iznosi između 1 na 1000 i 1 na 5000 u općoj populaciji te se nasljeđuje autosomno-dominantnim obrascem s varijabilnom penetrantnošću (27).

### **3.2.1. OSNOVE I MEHANIZMI**

Dezmosomi su ključni za normalno funkcioniranje stanične adhezije i signaliziranje te u svom klasičnom obliku bolesti ARVC pristune su mutacije u genima koji kodiraju dezmosomalne proteine dezmozoplakin (engl. desmoplakin; DSP), plakofilin 2 (engl. plakophilin 2; PKP2), dezmgolein 2 (engl. desmgolein 2; DSG2) i dezmozolin 2 (engl. desmocollin 2; DSC2) (28). PKP2 glavni je uzročni gen u ARVC te čini 36-92 % mutacija identificiranih u dezmosomalnim genima i dovodi do karakterističnog fenotipa za ARVC, za razliku od pacijenata s DSP mutacijom koji mogu razviti varijabilne fenotipe (ARVC, biventrikularna kardiomiopatija, izolirana aritmogena kardiomiopatija lijevog ventrikula) i DSG2 mutacijom koja se u 20-50 % slučajeva prezentira biventrikularnom kardiomiopatijom (29). U 30-50 % pacijenata s ACM prisutne su mutacije u nedezmosomalnim genima kao što su TMEM43, TGF $\beta$ 3, alpha T-catenin, titin, lamin A/C, PLN i dezmin; genske mutacije koje su također prisutne i u ostalim kardiomiopatijama (28). Razvojem NGS-a dodatno su otkrivene uzročne mutacije uključujući filamin C (engl. filamin C; FLNC), kadherin 2 (engl. cadherin 2; CDH2), alfa podjedinica natrijskog kanala Nav 1.5 (engl. sodium channel protein type 5 subunit alpha; SCN5A) i CDH2 (28).

### **3.2.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE ACM**

Prema preporučenoj reviziji kriterija za postavljanje dijagnoze ARVC-a za definitivnu dijagnozu potrebno je imati 2 velika ili 1 veliki i 2 mala ili 4 mala kriterija; graničnim nalazom smatra se 1 veliki i 1 mali ili 3 mala kriterija; moguća bolest smatra se nalazom 1 velikog ili 2 mala kriterija (30).

Uz pomoć revidiranih kriterija smjernice za genetsko testiranje preporučuju genetsko testiranje u navedenim slučajevima: (a) Sveobuhvatno ili ciljano genetsko testiranje uzročnih gena (DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, i TMEM43) u pacijenata u kojih je postavljena definitivna dijagnoza ACM/ARVC; (b) Genetsko testiranje može se razmotriti u bolesnika s graničnim nalazom; (c)

Genetsko testiranje ne preporučuje se u pacijenata s jednim malim kriterijem; (d) Genetsko testiranje preporučuje se za članove obitelji i krvne srodnike ako se pronađe uzročni gen u ispitivanog pacijenta odnosno propozitusa (25). U ranim stadijima bolesti ACM/ARVC obično je latentna bolest s nezamjetljivim znakovima i simptomima bolesti te prva manifestacija može biti SCD što dodatno naglašava važnost genetskog testiranja i ranog otkrivanja bolesti kako bi pravovremeno postavljena dijagnoza spriječila negativne ishode (25).

### **3.3. DILATATIVNA KARDIOMIOPATIJA (DCM)**

DCM definirana je prisutnošću dilatacije lijeve klijetke i sistoličkom disfunkcijom koja se ne može u potpunosti objasniti poremećajima volumnog i tlačnog opterećenja (31).

#### **3.3.1. OSNOVE I MEHANIZMI**

Towbin i sur. 1993. godine po prvi puta su utvrdili povezanost genetske mutacije i razvoja nasljedne X-vezane dilatativne kardiomiopatije otkrićem poremećaja u centromernom dijelu genomske regije koja kodira distrofin (engl. dystrophin; DMD) (32). Uzročne gene u nastanku DCM možemo na temelju patofiziološkog mehanizma nastanka bolesti podijeliti kao DCM nastalu zbog: manjka stvaranja sile, poremećaja u strukturi nuklearne lamine, poremećaja u prijenosu sile, poremećaja u posttranslacijskim modifikacijama proteina, poremećaja u staničnoj adheziji, manjka energetske proizvodnje, poremećaja u homeostazi kalcija, abnormalnosti ionskih kanala, poremećaja izrezivanja, epigenetskih perturbacija, nepravilnog savijanja proteina i nepravilnosti u RAS-MAPK signalnom putu (21). Više od 30 gena otkriveno je kao mogući uzrok nastanka familijalne DCM, ali niti jedan od utvrđenih gena ne nalazi se u više od 5 % slučajeva DCM (25). Najčešća mutacija u familijalnom obliku DCM (15-25 % slučajeva) nalazi se u kodirajućoj regiji



za TTN, najveći protein u ljudskom organizmu sastavljen od 35 000 aminokiselina koji se proteže duž cijele sarkomere i osigurava strukturalnu stabilnost i elastičnost sarkomere (33). Mutacije u LMNA genu koji kodira proteine lamin A i C (odgovorne za 5 % slučajeva familijalne DCM) dovode do poremećaja u mehanosignalnom putu što se klinički manifestira poremećajima provođenja i razvojem malignih aritmija (33). Mutacije u SCN5A koje možemo naći u Brugada sindromu i sindromu dugog QT intervala također se javljaju i u DCM i nose povećan rizik od razvoja malignih aritmija (33). Genetsko testiranje na familijalnu DCM ima prognostički i terapijski značaj jer pozitivan nalaz na mutacije u LMNA, DES, SCN5A i FLNC genima ukazuje na povećani rizik od SCD-a te se za pacijente s pozitivnim nalazom navedenih mutacija može razmotriti ugradnja implantabilnog kardioverter defibrilatora (25, 33).

### **3.3.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE DCM**

Prema HRS/EHRA smjernicama genetsko testiranje za DCM preporučuje se: (a) sveobuhvatno ili ciljano genetsko testiranje u pacijenata s potvrđenom dijagnozom DCM i značajnom bolesti srčanog provođenja (blok prvog, drugog ili trećeg stupnja) i/ili pozitivna obiteljska anamneza na SCD; (b) genetsko testiranje može biti korisno u pacijenata s familijalnom DCM kako bi se potvrdila dijagnoza i prepoznali pacijenti visokog rizika od razvoja malignih aritmija i sindromskih karakteristika kako bi se potaknuo obiteljski screening; (c) specifično testiranje na mutaciju preporučuje se za članove obitelji i krvne srodnike ako se pronađe uzročni gen u ispitivanog pacijenta odnosno propozitusa (25).

### **3.4. RESTRIKTIVNA KARDIOMIOPATIJA (RCM)**

RCM definira se poremećajem ventrikularnog punjenja i smanjenim dijastoličkim volumenom s urednom debljinom stijenke lijeve klijetke i ejekcijskom frakcijom (34).

#### **3.4.1. OSNOVE I MEHANIZMI**

Genetska etiologija RCM vezana je uz mutacije gena koji kodiraju strukturne proteine sarkomere, regulatorne proteine i intermedijarne filamente te bolest obično ima autosomno-dominantni obrazac nasljeđivanja, iako su opisani autosomno-recesivni oblici i sporadične mutacije (6). Najčešći uzročni gen u razvoju restriktivne kardiomiopatije je *TNNI3*, dok su rjeđe opisani uzročni geni *TNNT2*, *ACTC1*, *MYH7*, *MYBPC3*, *TTN*, *TPM1*, *MYPN*, *MYL3*, i *MYL2* (6). RCM rijetka je bolest te je zbog nedovoljnog broja testiranih pacijenata i količine genetskih informacija nedovoljno definirana. U restriktivnoj kardiomiopatiji dolazi do pojačane miokardijalne krutosti, poremećaja za vrijeme punjenja ventrikula i dijastoličke disfunkcije. Najčešće se prezentira slikom srčanog zatajivanja s očuvanom ejekcijskom frakcijom, no može se manifestirati poremećajima provođenja, atrijskom fibrilacijom i ventrikularnim aritmijama. Uzročni geni RCM značajno se preklapaju s uzročnim genima HCM, DCM, LVN i ACM. Uzročni geni RCM unutar iste obitelji mogu dovesti do različitih kliničkih fenotipa RCM. Smatra se kako na varijabilnost kliničke slike i različit fenotipski oblik bolesti u pojedinaca s identičnom mutacijom gena dodatno utječu okolišni čimbenici i čimbenici koji modificiraju gene (35). Osim familijalnih oblika primarne RCM, bolest se može pojaviti u sklopu sistemskih infiltrativnih bolesti (amiloidoza, sarkoidoza) i bolesti nakupljanja (Anderson-Fabryeva bolest, hereditarna hemokromatoza, Danonova bolest). Iako su navedene bolesti rijedak uzrok kardiomiopatije, važno ih je spomenuti jer za razliku od familijarnih oblika kardiomiopatija, za neke od njih postoji uspješna enzimska nadomjesna

terapija. Amiloidoza je infiltrativna bolest uzrokovana mutacijom gena za amiloidni laki lanac (engl. amyloid light-chain; AL) ili gena za amiloidni transtiretin (engl. amyloid transthyretin; ATTR) koji dovode do nakupljanja pogrešno savijenih proteinskih prekursora u amiloidna fibrilna vlakna (36). Anderson-Fabryeva bolest je rijetka X-vezana lizosomalna bolest nakupljanja koja nastaje zbog mutacija GLA gena koji kodira  $\alpha$ -galaktozidazu A. Nedostatak  $\alpha$ -galaktozidaze A dovodi do intracelularnog nakupljanja neutralnih glikosfingolipida i razvoja bubrežnih, srčanih i neurovaskularnih oštećenja (37).

### **3.4.2. PREPORUKE ZA GENETSKO TESTIRANJE RCM**

Preporuke prema HRS/EHRA smjernicama za genetsko testiranje RCM su: (a) genetsko testiranje može se razmotriti u pacijenata sa sumnjom na RCM na temelju kliničke slike, obiteljske anamneze i elektrokardiografskog/ehokardiografskog nalaza; (b) specifično testiranje na ciljane gene preporučuje se za članove obitelji i krvne srodnike ako se potvrdi mutacija ciljanog gena u ispitivanog pacijenta odnosno propozitusa (25).

## **4. METODE GENETSKOG TESTIRANJA U DIJAGNOSTICI KARDIOMIOPATIJA**

### **4.1. METODOLOGIJA GENETSKOG TESTIRANJA**

Genetsko testiranje za cilj ima otkriti genetsku mutaciju DNA za koju se smatra da ima ulogu u razvoju bolesti. Metoda koja razotkriva redoslijed nukleotida u DNA lancu zove se DNA sekvenciranje.

Allan Maxam i Walter Gilbert svoju su metodu sekvenciranja objavili 1977. godine. Maxam-Gilbertova metoda koristi jednolančanu DNA i metodu kemijskog cijepanja. Jedan kraj DNA (5') radioaktivno se obilježi s  $^{32}\text{P}$ . DNA se podijeli u 4 različite reakcijske posude, te se u svakoj od posuda DNA cijepa specifično ispred C, ispred C i T, ispred G, i ispred G i A. Smjesa iz reakcijskih posuda potom se razdvaja na poliakrilamidnom gelu elektroforezom. Maxam-Gilbertova metoda omogućava očitavanje sekvence od 300 do 400 nukleotida (38).

Sangerova dideoksi metoda koristi DNA uzorak, početnicu, DNA polimerazu, nukleotide i dideoksinukleotide. U četiri različite reakcijske posude postavljaju se radioaktivno obilježeni nukleotidi i dideoksinukleotidi. Vezanjem dideoksinukleotida dolazi do terminacije lanca. Dobiveni fragmenti potom se također elektroforezom razdvajaju s obzirom na veličinu (39). Sangerovo sekvencioniranje metoda je visoke osjetljivosti, ali je ograničena na analizu samo jednog DNA segmenta odjednom što postupak čini vremenski iscrpnim i skupocjenim s obzirom na genetičku heterogenost kardiomiopatija (40).

Otkrićem novih spoznaja i razvojem tehnologije u zadnjih 20 godina došlo je do ubrzanog razvoja sekvenciranja te možemo reći kako sve metode od 2005. godine nadalje spadaju u sekvenciranje nove generacije, ali metode dodatno dijelimo u sekvenciranje druge, treće i četvrte generacije kako bi istaknuli prednosti i nedostatke svake od njih.

Sekvenciranje druge generacije unaprijedilo je i eliminiralo nedostatke prve generacije. Metoda se sastoji od pripreme knjižnice DNA, imobilizacije fragmenta, umnožavanja, masovnog paralelnog sekvenciranja i računalnog sastavljanja sekvencija. Time je omogućeno paralelno čitanje više milijuna odsječaka, veća brzina, niži troškovi i izravno prepoznavanje izlazne sekvencije bez potrebe za elektroforezom. Glavni nedostatak metode su kratka očitavanja (41). Sekvenciranje druge generacije možemo podijeliti na: sekvenciranje ligacijom (engl. Sequencing by ligation; SBL) i sekvenciranje sintezom (engl. sequencing by synthesis; SBS) (42). Najpoznatiji predstavnici su Roche 454 i Illumina/Solexa. Roche 454 je SBS metoda koja koristi tehniku pirosekvenciranja temeljenu na detekciji pirofosfata oslobođenih ugradnjom nukleotida u sintetski rastući DNA lanac koja omogućuje relativno dugačka očitavanja (1000 pb) (30). Illumina/Solexa koristi SBS pristup te je trenutno najčešće korištena metoda u genetskom testiranju. Proces se sastoji od fragmentiranja DNA uzoraka, pričvršćivanja adaptera i učvršćivanja na podlogu te umnožavanja s pomoću lančane reakcije polimeraze (engl. polymerase chain reaction; PCR) koja stvara nakupine identičnih fragmenata. Nukleotidi se potom detektiraju laserskom ekscitacijom. Glavni nedostaci su neravnomjerna sinteza pojedinačnih komponenti nakupina fragmenata i opterećenje količinom uzorka koje rezultira preklapanjem nakupina identičnih fragmenata (42, 43).

Sekvenciranje treće generacije omogućuje proizvodnju dugih očitavanja te jeftinije i brže sekvenciranje bez potrebe korištenja PCR metode (41). Najpoznatiji predstavnici su PacBio i HeliScope. PacBio koristi tehnologiju sekvenciranja molekula u stvarnom vremenu (engl. single-molecule real time sequencing; SMRT) i ne zahtijeva amplifikaciju DNA PCR metodom, ali glavni nedostatak čine visoki stupanj pogreške (14 %), velike dimenzije uređaja i značajna financijska ulaganja (44). Vrijeme za pripremu uzorka iznosi 4-6 sati i duljine dugih očitavanja iznose 10 kpb (42).

Sekvenciranje četvrte generacije (Oxford Nanopore, Solid-state nanopore) koristi tehnologiju jednomolekularnog sekvenciranja nanoporama koje mogu biti čvrste ili biološke te omogućuje iznimno duga očitavanja, visok protok podataka i jeftinije sekvenciranje (41).

Sekvenciranje korištenjem visokoučinkovitih metoda (NGS) sada je standard u molekularnoj genetskoj dijagnostici za indeksnog pacijenta sa sumnjom na nasljednu kardiovaskularnu bolest. Laboratorijski troškovi za NGS stoga su niži, a analiza je brža od analize jednog gena (fazna genetska dijagnoza prema Sangerovoj metodi) (45).

NGS ovisno o opsežnosti testiranja uključuje:

- Testiranje panelom gena (poznati specifični geni bolesti integrirani u pojedini panel; "ciljano sekvenciranje egzoma"),
- kliničko sekvenciranje egzoma (fokusira se na svih oko 7000 gena koji su trenutno povezani s nasljednom bolešću),
- Sekvenciranje cijelog egzoma (engl. whole exome sequencing; WES) (približno 20 000 gena ili približno 180 000 egzona; 1,5 % genoma) i usredotočeno je na regije kodiranja genomskih proteina (egzone). Iako ljudski egzom predstavlja samo 1-5 % genoma, on sadrži približno 85 % poznatih varijanti povezanih s bolešću (46).
- Sekvenciranje cijelog genoma (engl. whole genome sequencing; WGS). Uključuje kodirajuća, nekodirajuća i područja mitohondrijske DNA. WGS proizvodi vrlo velike količine podataka koji zahtijevaju veliku količinu resursa za provođenje kao i sofisticiranu bioinformatičku ekspertizu za analizu.

Poboljšanja tehnologije NGS platformi i povećanje njihovog kapaciteta za sekvenciranje omogućili su točnu i brzu analizu većeg broja gena istovremeno i učinili su ih sve dostupnijima. (47).

U kliničkoj praksi za genetsku dijagnostiku nasljednih kardiovaskularnih bolesti obično se koriste panel gena ili WES, pri čemu se genetski podaci tada često selektivno procjenjuju specifično za bolest i indikaciju. Većina laboratorija preferira za analizu korištenje pojedinih specifičnih panela gena ciljano usmjerenih na pojedini poremećaj ili indikaciju, što pretragu čini još jednostavnijom i isplativijom (45).

Optimalan broj i opseg gena koji bi trebao biti uključen u pojedinu NGS analizu i dalje je tema istraživanja, radi izbjegavanja klinički beznačajnih gena. Potrebno je uključiti tzv. ključne gene (core genes) za pojedinu indikaciju i oni trebaju biti tehnički i kvalitativno pokriveni s više od 99 % u NGS analizi. Sve veće i dublje razumijevanje genetske osnove različitih nasljednih srčanih stanja pomoglo je u sve boljem odabiru prikladnih gena za uključivanje u NGS panele (9).

Niz znanstvenih i stručnih društava i asocijacija angažirani su na proćavanju odnosa i povezanosti gena i bolesti. Podaci proizašli iz takvih kolaboracija mogu se primijeniti u odabiru gena za uvrštavanja u pojedini genetski panel za genetsku analizu za pojedinu indikaciju, što vrijedi i za kardiomiopatije (9). Takva je organizacija i Gene Curation Coalition (GenCC), baza koja prikuplja i dijeli podatke suradnih grupa i istraživaća ukljućenih u procjenu proućavanja povezanosti i odnosa gena i bolest. Tako na primjer GenCC baza podataka sadrži klasifikacije za 4.629 gena koristeći standardizirane kriterije (48). Ova baza za svaki gen koristi srednju vrijednost za povezanost gena i bolesti (engl. consensus Level of Evidence; CLOE). Ta vrijednost je dobivena tako da se svaki od podnositelja za pojedini gen oćitovao (skala od 8 (definitivna povezanost) do -2 opovrgnuta povezanost), te je izraćunata srednja vrijednost povezanosti. To je rezultiralo klasifikacijskim sustavom u kojem se svaka srednja vrijednost  $>1$  moće smatrati znaćajnom, te je takav gen prikladan za uključivanje u panel za povezanu bolest. Od 178 gena tako dovedenih u

vezu s kardiovaskularnim bolestima, njih 150 je pokazalo značajan stupanj korelacije s tim bolestima i stoga bi trebali biti uključeni u genetsku analizu kardioloških panela. Što se pak kardiomiopatija tiče, ovim pristupom 41 HCM, 55 DCM, 20 ARVC i 7 LVNC gena se kvalificiraju i preporučuju za uključivanje u panel gena za NGS analizu kardiomiopatije (Tablica 3) (9).

Tablica 3. Geni s različitim razinama dokaza temeljenih na konsenzusnoj klasifikaciji u GenCC bazi podataka (cLoE – consensus Level of evidence) (9)

Bolest	Definitivna / jaka povezanost (cLoE > 5)	Umjerena povezanost (5 > cLoE > 4)	“potporni” geni (4 > cLoE > 3)	Ograničena povezanost (3 > cLoE > 2)	Kontroverzna povezanost (2 > cLoE > 1)
<b>HCM</b>	<i>ACTC1, ALPK3, COQ9, CSRP3, FLNC, MRPL44, MTO1, MYBPC3, MYH7, MYL2, MYL3, PRKAG2, TNNI3, TNNT2, TPM1</i>	<i>FHOD3, JPH2, PLN, TNNC1</i>	<i>TTN</i>	<i>ANKRD1, CALR3, CAV3, KLF10, MYH6, MYLK2, MYOM1, MYOZ2, MYPN, NEXN, OBSCN, PDLIM3, RYR2, SMYD1, TCAP, TRIM63, VCL</i>	<i>CACNB2, CASQ2, DSP, KCNQ1</i>
<b>DCM</b>	<i>BAG3, DES, DMD, DSP, FLNC, LMNA, MYH7, PLN, RBM20, SCN5A, TTN, TNNC1, TNNT2</i>	<i>ACTC1, ACTN2, JPH2, NEXN, PPCS, TNNI3, TPM1</i>	<i>ABCC9, LAMA4, VCL</i>	<i>ANKRD1, CSRP3, CTF1, DSG2, DTNA, EYA4, FKTN, GATAD1, ILK, LDB3, MYBPC3, MYBPHL, MYH6, MYL2, MYPN, NEBL, NKX2-5, OBSCN, PLEKHM2, PRDM16, PSEN2, RAF1, RPL3I, SGCD, TBX20, TCAP, TNNI3K, TXNRD2</i>	<i>MYL3, PDLIM3, PKP2, PSEN1</i>
<b>ARVC</b>	<i>DSC2, DSG2, DSP, JUP, PKP2, TMEM43</i>	<i>DES, PLN</i>	<i>CDH2</i>	<i>CTNNA3, LMNA, MYBPC3, MYH7, MYL3, RYR2, SCN5A, TGFB3, TJPI, TTN</i>	<i>LDB3</i>
<b>RCM</b>	-	-	-	-	-
<b>LVNC</b>	<i>MYBPC3, MIPEP</i>		<i>PRDM16</i>	<i>BMP10, DSG2, DTNA, SYNE2</i>	

HCM, hipertrofijska kardiomiopatija; DCM, dilatativna kardiomiopatija; ARVC, aritmogena kardiomiopatija desne klijetke; RCM, restriktivna kardiomiopatija; LVNC, nekompakcijska kardiomiopatija lijeve klijetke

Smjernice trenutno preporučuju fokusiranu analizu gena s poznatom korelacijom s bolešću kako bi se izbjeglo otkrivanje patogenih varijanti u genima s nesigurnom povezanošću s fenotipom pacijenta (17, 49). Unatoč tome, različiti laboratoriji koriste različito sastavljene panele (dijelom napravljene po mjeri ili “customizirane”), pa i kombinacije genskih panela, pri čemu neki od uključenih gena mogu imati slabe ili nimalo dokaza o povezanosti s ciljanom bolesti. Takva širina



s jedne strane može dati uvid u nove varijante uzroka bolesti, no što je NGS ispitivanje opsežnije i šire, s više uključenih gena, to je češće otkrivanje VUS (klasa 3 prema Američkom koledžu medicinske genetike (engl. American College of Medical Genetics; ACMG)) ili varijante u genima koje nisu povezane s indikacijom kao slučajni nalazi, što može doprinijeti kliničkoj dilemi (9).

Potrebno je naglasiti i da zbog heterogenosti srčanih stanja i manifestiranih fenotipova koje može pojedini gen izazvati, a koji se preklapaju, fokusirana analiza na specifičnu kardiomiopatiju i korištenje usko specijaliziranog panela gena (npr. samo za HCM) može previdjeti genetsku etiologiju bolesti. S obzirom na preklapanja i heterogenost fenotipa, te nepostojanje uvijek jednoznačnog odnosa genotip-fenotip, kod genetskog testiranja za kardiomiopatije se preporučuje provesti sveobuhvatnu analizu genskim panelom koji pokriva sve fenotipove kardiomiopatija, bez obzira na jasno manifestirani fenotip u pojedinog bolesnika (9).

## **4.2. KLASIFIKACIJA GENA I VARIJANTI**

ClinGen (Clinical GenomeResource) je ustanova ustrojena u sklopu Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. National Institutes of Health; NIH), SAD, koja proučava i utvrđuje kliničku važnost gena i njihovih varijanti u medicini (<https://clinicalgenome.org>). Pojam varijanta gena se preferira naspram pojma mutacija.

U djelokrugu aktivnosti ClinGen-a su sljedeći aspekti gena i varijanti (50):

- Gene disease validity (valjanost povezanosti gena i bolesti): odnosi se na procjenu stupnja povezanosti pojedinog gena i bolesti
- Clinical actionability (klinička primjenjivost): govori u kojem stupnju genetske varijante imaju kliničke posljedice u smislu mogućnosti intervencije na temelju rezultata genetskog

testiranja – prevencije, praćenja i terapijskih postupaka povezanih bolesti u slučaju pozitivnog nalaza.

- Variant pathogenicity (patogenost genetske varijante): odnosi se na potencijal pojedine genetske varijante da izazove nastanak bolesti prema ACMG kriterijima (51).
- Dosage sensitivity (osjetljivost na broj kopija gena): odnosi se na osjetljivost organizma na promjene u broju kopija određenog gena. To uključuje i povećanje (duplikacije) i smanjenje (delecije) broja kopija gena.

Najvažnija kategorija za klasifikaciju gena je kategorija valjanost povezanosti gena i bolesti. Ova kategorija definira razinu dokaza u kojoj je mjeri, prema dosadašnjim spoznajama, neki gen uzrok bolesti. Na temelju kataloga kriterija, postoje sljedeće razine dokaza o povezanosti gena i bolesti:

- definitivno
- jako
- umjereno
- ograničeno (ograničeno prema trenutnim medicinsko-eksperimentalnim spoznajama),
- osporeno (osporeno u stručnoj literaturi),
- opovrgnuto (opovrgnuto, unatoč nekim publikacijama, nema dokazane veze s bolešću).

Core gene (ključni geni) su geni povezani s pojedinim patološkom stanjem koji, prema ClinGen-u, su najmanje umjereno povezani s istim (dakle “definitivni”, “jaki” ili “umjereni”). ACMG definirao je način procjene patogenosti genetskih varijanti u kliničkoj genetskoj dijagnostici (50).

Patogenost pojedine varijante se kategorizira u jedan od 5 različitih stupnjeva:

- pathogenic (patogena) (klasa 5 prema ACMG),
- likely pathogenic (vjerojatno patogena) (klasa 4 prema ACMG),
- variant of unknown significance (varijanta s nejasnim značenjem - VUS) (klasa 3 prema ACMG),

- likely benign (vjerojatno benigna) (klasa 2 prema ACMG) i
- benign (benigna) (klasa 1 prema ACMG).

Vjerojatnost patogenosti varijante za klasu 5 prema ACMG-u je >95 %, za klasu 4 prema ACMG-u >90 %, dok klasa 3 ("VUS") prema ACMG-u ima relativno široku, nespecifičnu vjerojatnost (10-90 %) (52)

„Patogene“ i „vjerojatno patogene“ varijante (klasa 5 ili 4 prema ACMG-u) smatraju se pozitivnim genetskim nalazima, odnosno varijante se smatraju uzrokom bolesti. Benigne i vjerojatno benigne varijante (klasa 2 ili 1 prema ACMG-u), s druge strane, smatraju se negativnim rezultatom. Dugo korišten izraz "mutacija" više se ne bi trebao koristiti (45). VUS nije pozitivan nalaz, no predstavlja poseban izazov za interpretaciju i daljnje praćenje, s obzirom na to da je dugoročno moguća reklasifikacija kategorije.

### **4.3. NALAZ GENETSKOG TESTIRANJA**

Nakon završenog genetskog testiranja, izdaje se nalaz koji mora biti lako razumljiv i pacijentima i kliničarima (53). Zbog važnosti prikladnog izvještavanja o nalazima genetskih dijagnostičkih testova, postoje smjernice i upute koje svaki nalaz genetskog testiranja treba slijediti i kako bi trebao biti formatiran. Nalaz mora sadržavati razlog zbog kojeg je pacijent upućen na genetičko testiranje i gene testirane na temelju fenotipa pacijenta (9). Također se moraju navesti baze podataka korištene za odabir gena, kao i cijeli niz tehničkih detalja poput ciljanih područja testa, referentne sekvence korištene za poravnanje i odgovarajuće transkripte, te točan opis primijenjene NGS tehnologije (54). Nadalje treba predočiti pojedinosti o bioinformatičkim tehnikama i alatima korištenim za detekciju i interpretaciju varijanti. Patogene, vjerojatno patogene i VUS varijante

moraju biti jasno označene i opisane, sukladno preporukama ACMG-a. Kod VUS-a trebaju se navesti ACMG kriteriji korišteni za njegovu kategorizaciju i očekivani utjecaj na funkciju proteina (9).

## **5. KLINIČKI ASPEKTI GENETSKOG TESTIRANJA U KARDIOMIOPATIJAMA**

### **5.1. GENETSKI PROBIR**

Genetska procjena kardiomiopatije uključuje postavljanje dijagnoze i fenotipa kardiomiopatije, postavljanje indikacije i opravdanosti za genetsko testiranje, dokumentiranje temeljite i detaljne obiteljske anamneze, individualizirano savjetovanje pacijenata radi rješavanja specifičnih problema i molekularno genetsko testiranje, obično etabliranim panelima poznatih srčanih monogenih varijanti (55).

Ključni element u probiru indeksnih bolesnika prije testiranja je verifikacija fenotipa bolesti. Drugi element je precizna obiteljska anamneza i obiteljsko stablo koji obuhvaćaju najmanje 3 generacije. Ako ova dva elementa ukazuju na moguću nasljednu kardiovaskularnu bolest, tada je sljedeći korak identificirati najprikladniju osobu za genetsko testiranje (56). Genetsko testiranje obično bi trebalo biti rezervirano za pacijente s potvrđenom dijagnozom ili sumnjom na nasljednu kardiovaskularnu bolest ili za pojedince s visokim a priori rizikom koji proizlazi iz prethodno identificirane patogene varijante u njihovoj obitelji.

Uzimanje obiteljske anamneze mora zahvatiti najmanje tri generacije, uz pretpostavljanje mogućih obrazaca nasljeđivanja i penetracije, te procjenu mogućnosti i utemeljenosti kaskadnog testiranja za rođake (57). Obiteljska je anamneza nažalost često nepotpuna i nismo uvijek u mogućnosti identificirati sve bolesnike s kardiomiopatijom unutar jedne obitelji. Pritom uvijek treba računati i s mogućnosti pojave de novo genetske varijante (58).

Uloga kliničara je ključna u fazi prije genetskog testiranja, te se sastoji u probiru pacijenata, identifikaciji fenotipa, postavljanju indikacije za genetsko testiranje, te formulaciji adekvatnog kliničkog upita usmjerenog genetičarima.

Za potrebe genetske analize obično se uzima uzorak krvi te vrijeme obrade iznosi 8 do 12 tjedana (25).

## **5.2. INTERPRETACIJA NALAZA**

Ciljevi genetskog testiranja su identificirati bolest i/ili potvrditi kliničku dijagnozu, omogućiti individualizirani terapijski pristup i po potrebi inicirati kaskadno testiranje unutar obitelji bolesnika. Pogrešno ili nepotpuno tumačenje nalaza može negativno utjecati ne samo na dijagnostički postupak i terapijski pristup, već i na prognozu bolesnika te imati šire posljedice i na članove obitelji probanda (59, 60).

Kod genetskog testiranja za procjenu patogenosti varijanti gena kao mogućih uzročnika bolesti koriste se revidirani kriteriji ACMG-a koji varijante klasificiraju kao: patogene, vjerojatno patogene, VUS, vjerojatno benigne i benigne (61).

Patogene i vjerojatno patogene varijante smatraju se pozitivnim genetskim nalazima i smatramo ih uzrokom bolesti. Benigne i vjerojatno benigne varijante s druge strane, smatraju se negativnim rezultatom. VUS ne predstavlja pozitivan nalaz, i ne bi trebao utjecati na donošenje i temeljenje medicinskih odluka. Međutim potrebno ih je navesti u nalazu, te dugoročno pratiti u bazama radi moguće reklasifikacije patogenosti u budućnosti.

Danas dijagnostički prinos testiranja (yield) kardiomiopatija iznosi između 30-50 % za HCM, 20-30 % za DCM i 50 % za ARVC (26).

Tradicionalna Mendelova paradigma klasičnih rijetkih varijanti koje uzrokuju jasno opisane monogene kardiomiopatske fenotipove može biti nedovoljna. Sve je više prepoznat segment kardiomiopatija s digenom i oligogenom etiologijom (62), što ukazuje na to da kombinacija više

varijanti pojedinih gena može imati nepovoljan kumulativni učinak koji rezultira jačom penetracijom bolesti i ranijom manifestacijom (55).

U međuvremenu se genetsko testiranje kardiomiopatija usredotočilo na podskupinu od 40-100 srčanih gena s relativno dobro utvrđenim genetskim varijantama koje su povezane s kardiomiopatijama. Dosadašnje spoznaje o kliničkom značaju pojedinih varijanti svih gena, prikupljene od strane kliničkih i istraživačkih laboratorija, ekspertnih skupina i kliničara, objedinjene su i dostupne u ClinVaru. ClinVar je javna baza podataka o varijantama i njihovoj povezanosti s fenotipom i bolešću te se koristi za klasifikaciju varijanti i kod tumačenja nalaza (9).

Poseban izazov u dugoročnoj interpretaciji nalaza predstavlja moguća promjena klasifikacije genetskih varijanti, u prvom redu VUS-a, i dio je procesa genetskog testiranja i savjetovanja (60). Moguća je situacija da se s vremenom i sve većom količinom medicinskih istraživačkih podataka patogenst pojedinih varijanti reklasificira u bazama. Tako se VUS na primjer može reklasificirati ili kao patogena varijanta ili pak kao benigna. Ovakve reklasifikacije genetskih varijanti iako nisu neobične, no mogu izazvati distres i konfuziju za pacijente i njihove obitelji. Odgovarajuće genetsko savjetovanje multidisciplinarnog tima ključno je za rješavanje ovih potencijalnih problema. Sve ovo naglašava da genetsko testiranje nije jednokratni postupak već kontinuirani proces.

### **5.3. GENETSKO SAVJETOVANJE**

Genetsko savjetovanje od strane kompetentnog genetskog savjetnika dio je svakog genetskog testiranja i uvijek treba biti ponuđeno bolesniku i obitelji prije i poslije genetske analize (10, 47).

Trebali bi ga provoditi zdravstveni radnici s posebnom obukom, kao što su genetski savjetnici, genetske medicinske sestre, ili klinički/medicinski genetičari, bez obzira na to razmatra li se genetsko testiranje. Genetsko savjetovanje uključuje raspravu o rizicima nasljeđivanja, pružanje edukacije uključujući potrebu za kliničkom procjenom, obavljanje savjetovanja prije i poslije genetskog testiranja, pregled varijantnih klasifikacija, dobivanje obiteljske povijesti od najmanje tri generacije i pružanje psihosocijalne podrške, kako bolesniku, tako i članovima obitelji (63).

Genetsko savjetovanje prije samog testiranja je od iznimne važnosti, i često se djelatnost genetskog savjetnika preklapa s onom kliničara kardiologa. U pre-testnoj je fazi pored prikupljanja svih kliničkih informacija o bolesniku i njegovoj obitelji, potrebno jasno objasniti svrhu analize i dati informacije o genima koji se proučavaju. Bolesnike treba obavijestiti o mogućnosti otkrivanja varijanti koje mogu predisponirati bolesti izvan primarnog kliničkog upita (nenamjerni ili slučajni nalazi) (47).

Nakon testa, u slučaju prispjeca negativnog rezultata, bolesniku treba jasno priopćiti da negativan genetski test ne mora isključiti prisutnost nasljednog stanja (64). Ako se identificira VUS, treba poduzeti iste korake kao kod negativnog rezultata s pozitivnom obiteljskom poviješću. Bolesnik i obitelj trebaju biti obaviješteni da nalaz ne isključuje mogućnost nasljednog kardiološkog poremećaja u obitelji, uz preporuku nastavka nadzora probanda i ugroženih članova obitelji. Također treba priopćiti mogućnost buduće reklasifikacije patogenosti otkrivenih varijanti, u prvom redu VUS-a (51).

Ako genetski test polučiti pozitivan rezultat, smatramo da je identificirana genska varijanta odgovorna za bolest. Ovaj nalaz potvrđuje genetsku etiologiju bolesti i ima dijagnostičke implikacije. Pomaže u liječenju pacijenata, obiteljskom kaskadnom testiranju, i u nekim



slučajevima, usmjeravanju terapijskih izbora. Po završetku testa, rezultati genetske analize trebaju biti jasno iskomunicirani (53).

Neuključivanje posvećenih i educiranih genetskih savjetnika u proces genetskog testiranja i obrade može se negativno odraziti na pacijentovo razumijevanje bolesti i donošenje odluka, te tako ugroziti ishod liječenja. (58).

#### **5.4. KASKADNO OBITELJSKO TESTIRANJE**

Genetsko testiranje kardiomiopatija započinje od propozitusa ili indeksnog pacijenta, odnosno pacijenta s postavljenom kliničkom dijagnozom bolesti ili sumnjom na bolest. Ako se dođe do otkrića uzročnog gena, moguće je obaviti genetsko testiranje članova obitelji i krvnih srodnika propozitusa (25).

Nakon što se identificira patogeni gen, informacije o potencijalnoj genetskoj varijanti koja može utjecati na ljude kroz generacije članova obitelji treba prenijeti onima koji su pod rizikom (58).

Genetske kardiomiopatije povezane su s različitom penetracijom (srodnici s pozitivnim genotipom ne moraju nužno manifestirati bolest) i varijabilnom ekspresijom (različiti stupnjevi težine kod rođaka različite dobi) (55). Savjetovanje prije i nakon testiranja za pojedince koji se podvrgavaju genetskom testiranju obiteljske varijante trebalo bi uzeti u obzir potencijalni učinak pozitivnog rezultata, uključujući i njegovu ograničenu prediktivnu vrijednost za kliničke manifestacije. Rođaci za koje je potvrđeno da imaju obiteljsku varijantu mogu, ali ne moraju nikada ispoljiti znakove bolesti. Oni međutim zahtijevaju inicijalnu kliničku obradu i kontinuirani klinički nadzor (65). Ovakav pristup omogućava brzo započinjanje terapije kod osoba s pozitivnim genotipom nakon što se fenotip manifestira (55).

Ako se u bolesnika s fenotipom kardiomiopatije genetskim testiranjem utvrdi VUS ili bilo koji negativan rezultat, rodbinu se i dalje potiče da sudjeluju u periodičnom kliničkom praćenju, budući da mogu naknadno manifestirati fenotip (58).

Eventualnu naknadnu reklasifikaciju stupnja patogenosti genetskih varijanti potrebno je isto iskomunicirati članovima obitelji, koji se tada moraju ponovno kontaktirati i primjereno savjetovati. Reklasifikacije genetskih varijanti mogu izazvati pomutnju i nesigurnost kod pacijenata i njihovih obitelji, te je važno kontinuirano prateće genetsko savjetovanje multidisciplinarnog tima (58, 66).

## **5.5. KORISTI GENETSKOG TESTIRANJA**

Koristi genetskog testiranja su višestruke, testiranje omogućuje otkrivanje bolesti u ranoj fazi i pravovremenu intervenciju kako bi se spriječili negativni ishodi i promijenio tijek bolesti, daje prognostičke informacije o tijeku bolesti te pacijentima i obitelji pružaju se psihosocijalni benefiti kako bi što jasnije razumjeli prirodu i narav bolesti (25).

Dijagnoza kardiomiopatije kod pogođenih pojedinaca primarno se postavlja na temelju fenotipske definicije bolesti, bez nužnog dokaza genetske etiologije. Međutim, uz odgovarajuće genetsko savjetovanje i uz upozorenje da će nalaz biti klinički značajan samo ako se pronađe patogena ili vjerojatno patogena varijanta, genetsko testiranje može biti korisno i u razjašnjavanju graničnih slučajeva (6).

Sve češće genetska dijagnoza može imati i prognostičke i terapijske implikacije. Na primjer, patogene varijante u genu LMNA proteina nuklearne ovojnice mogu dovesti do razvoja

progresivnog oblika DCM ili ACM, što mijenja terapijske odluke s nižim pragom za primarnu prevenciju u vidu implantacije kardioverter defibrilatora (67).

Kod pacijenata s HCM-om, genetsko testiranje omogućuje razlikovanje primarnih kardiomiopatija od fenokopija kao što su TTR-kardijalna amiloidoza, Fabryjeva bolest, Danonova bolest i bolesti skladištenja glikogena (68). Ranijim otkrivanjem visokorizičnih pojedinaca, ciljane terapije mogu se započeti ranije kako bi se spriječilo napredovanje kardiomiopatija (69).

Na kraju, genetsko testiranje može imati i posljedice po reproduktivno zdravlje i planiranje obitelji. Pacijentima i obiteljima je potrebno pružiti razumljive informacije o obrascima nasljeđivanja i riziku prijenosa na buduću djecu, te pružiti informacije o mogućnostima planiranja i prenatalne dijagnostike ili predimplantacijske genetske dijagnostike (6).

## **6. ETIČKI I PRAVNI ASPEKTI GENETSKOG TESTIRANJA U DIJAGNOSTICI KARDIOMIOPATIJA**

Beauchamp i Childress definirali su temeljne principe etičkog ponašanja u medicini kojih se treba držati i u slučaju genetskog testiranja pacijenata. Principi uključuju poštivanje autonomije pacijenta, imperativ da se ne nanosi šteta pacijentu (neškodljivost), koncept pravednosti i dobročinstva te obveze zdravstvenih djelatnika od kojih se očekuje istinitost, privatnost, povjerljivosti i moralno ispravno ponašanje (70).

Kako bi se genetsko testiranje provelo, potrebno je od pacijenta pribaviti informirani pristanak. Informirani pristanak pacijentu opisuje metodu provođenja testiranja, svrhu ispitivanja, biološki uzorak potreban za analizu, značenje dobivenih rezultata, uključujući pozitivne i negativne rezultate, nalaz VUS, mogućnost lažno pozitivnih i lažno negativnih rezultata, hoće li rezultati pružiti informacije o zdravstvenom stanju članova obitelji i krvnih srodnika o riziku razvoja bolesti ili mogućnosti vertikalnog prijenosa mutacije na potomke i što će se dogoditi s uzorkom nakon završetka testa (40). Budući da je temeljni problem u genetskoj dijagnostici kardiomiopatija otkriće VUS te još nedovoljno definirano značenje dobivenih rezultata, genetsko savjetovanje prije i poslije testiranja mora obaviti genetičar osposobljen za interpretaciju rezultata, u konzultacijama s kardiologom, uzimajući u obzir kliničku sliku, obiteljsku anamnezu i dijagnostičke parametre (40).

Od mnogobrojnih koristi genetskog testiranja, smatra se da je najveća upravo redosljedno testiranje krvnih srodnika nakon identifikacije ciljane mutacije u propozitusa. Zdravstveni djelatnici dužni su poštovati povjerljivost i autonomiju pacijenta, što predstavlja izazov u identifikaciji i kontaktiranju potencijalno ugroženih članova obitelji i krvnih srodnika osobe kod koje je utvrđen uzročni gen (71). U iznimnim slučajevima kada podaci ukazuju na visoki rizik od razvoja bolesti, a pacijent i nakon genskog savjetovanja odbija podijeliti informacije s obitelji, može postojati osnova za zakonsko i etično otkrivanje podataka (71).

## 7. ZAKLJUČAK

Kardiomiopatije predstavljaju kompleksnu i heterogenu skupinu srčanih bolesti koje dovode do značajnih zdravstvenih problema. Dijagnostika i liječenje ovih bolesti su izazovni zbog njihove heterogenosti i genotipskog i fenotipskog preklapanja. U posljednjem desetljeću, genetsko testiranje postalo je ključan dijagnostički i prognostički alat koji omogućuje dublji uvid u kompleksne mehanizme nastanka bolesti. NGS omogućuje paralelno masivno sekvenciranje čitavog genoma uz znatno niže troškove i kraće vrijeme obrade podataka. Otkrića o mutacijama u ključnim genima poput MYH7 za HCM, dezmosomalnih gena za ACM i TTN u DCM, postavljeni su temelji za razumijevanje nastanka ovih bolesti. Genetsko testiranje pruža individualizirani pristup svakom pacijentu i interpretaciju rezultata uz pomoć kojih je pacijentu i njegovim krvnim srodnicima ranom intervencijom i ciljanom terapijom moguće osigurati pravovremeno liječenje i prevenirati negativne ishode poput iznenadne srčane smrti. Implementacija genetskog testiranja u svakodnevnu kliničku praksu s vremenom će postati uobičajena praksa te će uz pomoć dijagnostičkih algoritama omogućiti ranije postavljanje dijagnoze, procjenu rizika i informiranje pacijenata i krvnih srodnika o zdravstvenom stanju. Unatoč sve dostupnijem i jeftinijem genetskom testiranju kardiomiopatija, velika količina informacija genetskih informacija donosi mnoge izazove poput interpretacije nejasnih rezultata, etičkih dilema i troškova testiranja. Unatoč brojnim izazovima, postignuti su izvanredni napredci u sferi molekularne kardiologije te postoje obećavajuće perspektive za poboljšanje brige o bolesnicima i njihovim obiteljima putem preciznog pristupa dijagnostici i terapiji.

## **8. ZAHVALE**

Zahvaljujem se svom mentoru, doc.dr.sc. Mariju Udovičiću na ukazanom strpljenju, pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala mojoj obitelji, majci Beti, ocu Ivi i sestri Mariji koji su bili moja najveća podrška tijekom mog školovanja. Njihova ljubav, razumijevanje i ohrabrenja pomogla su mi nositi se sa svim izazovima. Također, zahvaljujem svim svojim prijateljima i kolegama koji su mi bili potpora i oslonac za vrijeme svih prepreka i poteškoća. Vaše prijateljstvo, savjeti i podrška učinili su studentske dane mnogo lakšim i ispunjenijim.

## 9. LITERATURA

1. Elliott P, Andersson B, Arbustini E, Bilinska Z, Cecchi F, Charron P, et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2008;29(2):270-6.
2. Seidman CE, Seidman JG. Identifying sarcomere gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy: a personal history. *Circ Res*. 2011;108(6):743-50.
3. Maron BJ, Towbin JA, Thiene G, Antzelevitch C, Corrado D, Arnett D, et al. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2006;113(14):1807-16.
4. Arbustini E, Narula N, Tavazzi L, Serio A, Grasso M, Favalli V, et al. The MOGE(S) classification of cardiomyopathy for clinicians. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(3):304-18.
5. Salemi VMC, Mohty D, Altavila SLL, Melo MDT, Kalil Filho R, Bocchi EA. Insights into the Classification of Cardiomyopathies: Past, Present, and Future Directions. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021;76:e2808.
6. Arbelo E, Protonotarios A, Gimeno JR, Arbustini E, Barriales-Villa R, Basso C, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies: Developed by the task force on the management of cardiomyopathies of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2023;44(37):3503-626.
7. Dalal D, James C, Devanagondi R, Tichnell C, Tucker A, Prakasa K, et al. Penetrance of mutations in plakophilin-2 among families with arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(7):1416-24.
8. Claes GRF, van Tienen FHJ, Lindsey P, Krapels IPC, Helderma-van den Enden ATJM, Hoos MB, et al. Hypertrophic remodelling in cardiac regulatory myosin light chain (MYL2) founder mutation carriers. *European Heart Journal*. 2015;37(23):1815-22.
9. Papadopoulou E, Bouzarelou D, Tsaousis G, Papathanasiou A, Vogiatzi G, Vlachopoulos C, et al. Application of next generation sequencing in cardiology: current and future precision medicine implications. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1202381.

10. Bonaventura J, Polakova E, Vejtasova V, Veselka J. Genetic Testing in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(19):10401.
11. Asselbergs FW, Sammani A, Elliott P, Gimeno JR, Tavazzi L, Tendera M, et al. Differences between familial and sporadic dilated cardiomyopathy: ESC EORP Cardiomyopathy & Myocarditis registry. *ESC heart failure*. 2021;8(1):95-105.
12. Orphanou N, Papatheodorou E, Anastasakis A. Dilated cardiomyopathy in the era of precision medicine: latest concepts and developments. *Heart failure reviews*. 2022;27(4):1173-91.
13. Hershberger RE, Givertz MM, Ho CY, Judge DP, Kantor PF, McBride KL, et al. Genetic evaluation of cardiomyopathy: a clinical practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*. 2018;20(9):899-909.
14. Kostareva A, Kiselev A, Gudkova A, Frishman G, Ruepp A, Frishman D, et al. Genetic spectrum of idiopathic restrictive cardiomyopathy uncovered by next-generation sequencing. *PLoS One*. 2016;11(9):e0163362.
15. Brodehl A, Gerull B. Genetic insights into primary restrictive cardiomyopathy. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(8):2094.
16. Tadros R, Francis C, Xu X, Vermeer AM, Harper AR, Huurman R, et al. Shared genetic pathways contribute to risk of hypertrophic and dilated cardiomyopathies with opposite directions of effect. *Nature genetics*. 2021;53(2):128-34.
17. Wilde AA, Semsarian C, Márquez MF, Shamloo AS, Ackerman MJ, Ashley EA, et al. European heart rhythm association (EHRA)/heart rhythm society (HRS)/Asia pacific heart rhythm society (APHRS)/latin American heart rhythm society (LAHRS) expert consensus statement on the state of genetic testing for cardiac diseases. *Europace*. 2022;24(8):1307-67.
18. Maron BJ. Hypertrophic CardiomyopathyA Systematic Review. *JAMA*. 2002;287(10):1308-20.
19. members ATF, Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: The Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*. 2014;35(39):2733-79.
20. Marian AJ, Braunwald E. Hypertrophic Cardiomyopathy: Genetics, Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Therapy. *Circ Res*. 2017;121(7):749-70.



21. Araco M, Merlo M, Carr-White G, Sinagra G. Genetic bases of dilated cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2017;18(3):123-30.
22. Elliott PM, Anastasakis A, Borger MA, Borggrefe M, Cecchi F, Charron P, et al. 2014 ESC Guidelines on diagnosis and management of hypertrophic cardiomyopathy: the Task Force for the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2014;35(39):2733-79.
23. Craig R, Padrón R. Chapter 7 Molecular Structure of the Sarcomere. 2004. p. 129-66.
24. Marian AJ. Molecular Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ Res*. 2021;128(10):1533-53.
25. Ackerman MJ, Priori SG, Willems S, Berul C, Brugada R, Calkins H, et al. HRS/EHRA expert consensus statement on the state of genetic testing for the channelopathies and cardiomyopathies this document was developed as a partnership between the Heart Rhythm Society (HRS) and the European Heart Rhythm Association (EHRA). *Heart rhythm*. 2011;8(8):1308-39.
26. Ingles J, Bagnall RD, Semsarian C. Genetic Testing for Cardiomyopathies in Clinical Practice. *Heart Fail Clin*. 2018;14(2):129-37.
27. Basso C, Corrado D, Marcus FI, Nava A, Thiene G. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Lancet (London, England)*. 2009;373(9671):1289-300.
28. Karmouch J, Protonotarios A, Syrris P. Genetic basis of arrhythmogenic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol*. 2018;33(3):276-81.
29. Gandjbakhch E, Redheuil A, Pousset F, Charron P, Frank R. Clinical Diagnosis, Imaging, and Genetics of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/Dysplasia: JACC State-of-the-Art Review. *J Am Coll Cardiol*. 2018;72(7):784-804.
30. Marcus FI, McKenna WJ, Sherrill D, Basso C, Bauce B, Bluemke DA, et al. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation*. 2010;121(13):1533-41.
31. Pinto YM, Elliott PM, Arbustini E, Adler Y, Anastasakis A, Böhm M, et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: a position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J*. 2016;37(23):1850-8.

32. Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, et al. X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation*. 1993;87(6):1854-65.
33. Wilcox JE, Hershberger RE. Genetic cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol*. 2018;33(3):354-62.
34. Kushwaha SS, Fallon JT, Fuster V. Restrictive cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1997;336(4):267-76.
35. Brodehl A, Gerull B. Genetic Insights into Primary Restrictive Cardiomyopathy. *J Clin Med*. 2022;11(8).
36. Rapezzi C, Aimo A, Barison A, Emdin M, Porcari A, Linhart A, et al. Restrictive cardiomyopathy: definition and diagnosis. *Eur Heart J*. 2022;43(45):4679-93.
37. O'Mahony C, Elliott P. Anderson-Fabry disease and the heart. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;52(4):326-35.
38. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(2):560-4.
39. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
40. Girolami F, Frisso G, Benelli M, Crotti L, Iascone M, Mango R, et al. Contemporary genetic testing in inherited cardiac disease: tools, ethical issues, and clinical applications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2018;19(1):1-11.
41. Štimac I, Martinković F. Uvod u tehnologije sekvenciranja novih generacija. *Croatian Veterinary Reports/Hrvatski Verinarski Vjesnik*. 2021;29(3).
42. Kchouk M, Gibrat J-F, Elloumi M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biology and Medicine*. 2017;09.
43. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122(1):e59.
44. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021;82(11):801-11.
45. Schulze-Bahr E, Klaassen S, Gerull B, Von Kodolitsch Y, Landmesser U, Rieß O, et al. Gendiagnostik bei kardiovaskulären Erkrankungen. *Die Kardiologie*. 2023;17(5):300-49.

46. Norton ME, Ziffle JV, Lianoglou BR, Hodoglugil U, Devine WP, Sparks TN. Exome sequencing vs targeted gene panels for the evaluation of nonimmune hydrops fetalis. *Am J Obstet Gynecol.* 2022;226(1):128.e1-.e11.
47. Scherr CL, Kalke K, Ramesh S, Fakhari H, Dellefave-Castillo LM, Smith ME, et al. Integrating clinical genetics in cardiology: Current practices and recommendations for education. *Genet Med.* 2022;24(5):1054-61.
48. DiStefano MT, Goehringer S, Babb L, Alkuraya FS, Amberger J, Amin M, et al. The Gene Curation Coalition: A global effort to harmonize gene–disease evidence resources. *Genetics in Medicine.* 2022;24(8):1732-42.
49. Musunuru K, Hershberger RE, Day SM, Klinedinst NJ, Landstrom AP, Parikh VN, et al. Genetic testing for inherited cardiovascular diseases: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation: Genomic and Precision Medicine.* 2020;13(4):e000067.
50. Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, Bustamante CD, Evans JP, Landrum MJ, et al. ClinGen--the Clinical Genome Resource. *N Engl J Med.* 2015;372(23):2235-42.
51. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.
52. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* 2008;29(11):1282-91.
53. Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *European Journal of Human Genetics.* 2022;30(9):1011-6.
54. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(1):2-5.
55. Kontorovich AR. Approaches to Genetic Screening in Cardiomyopathies. *JACC: Heart Failure.* 2023;11(2):133-42.
56. Musunuru K, Hershberger RE, Day SM, Klinedinst NJ, Landstrom AP, Parikh VN, et al. Genetic Testing for Inherited Cardiovascular Diseases: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation: Genomic and Precision Medicine.* 2020;13(4):e000067.

57. Yogasundaram H, Alhumaid W, Dzwiniel T, Christian S, Oudit GY. Cardiomyopathies and Genetic Testing in Heart Failure: Role in Defining Phenotype-Targeted Approaches and Management. *Can J Cardiol.* 2021;37(4):547-59.
58. Aiyer S, Kalutskaya E, Agdamag AC, Tang WHW. Genetic Evaluation and Screening in Cardiomyopathies: Opportunities and Challenges for Personalized Medicine. *J Pers Med.* 2023;13(6).
59. Evans JP, Skrzynia C, Burke W. The complexities of predictive genetic testing. *Bmj.* 2001;322(7293):1052-6.
60. Arbustini E, Behr ER, Carrier L, van Duijn C, Evans P, Favalli V, et al. Interpretation and actionability of genetic variants in cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Council on cardiovascular genomics. *European Heart Journal.* 2022;43(20):1901-16.
61. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine.* 2015;17(5):405-23.
62. Li L, Bainbridge MN, Tan Y, Willerson JT, Marian AJ. A potential oligogenic etiology of hypertrophic cardiomyopathy: a classic single-gene disorder. *Circulation research.* 2017;120(7):1084-90.
63. Bordet C, Brice S, Maupain C, Gandjbakhch E, Isidor B, Palmyre A, et al. Psychosocial Impact of Predictive Genetic Testing in Hereditary Heart Diseases: The PREDICT Study. *Journal of Clinical Medicine.* 2020;9(5):1365.
64. Wilde AAM, Semsarian C, Márquez MF, Sepeshri Shamloo A, Ackerman MJ, Ashley EA, et al. European Heart Rhythm Association (EHRA)/Heart Rhythm Society (HRS)/Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS)/Latin American Heart Rhythm Society (LAHRS) Expert Consensus Statement on the state of genetic testing for cardiac diseases. *J Arrhythm.* 2022;38(4):491-553.
65. Hershberger RE, Lindenfeld J, Mestroni L, Seidman CE, Taylor MR, Towbin JA. Genetic evaluation of cardiomyopathy—a Heart Failure Society of America practice guideline. *Journal of cardiac failure.* 2009;15(2):83-97.

66. Taylor J, Craft J, Blair E, Wordsworth S, Beeson D, Chandratre S, et al. Implementation of a genomic medicine multi-disciplinary team approach for rare disease in the clinical setting: a prospective exome sequencing case series. *Genome Med.* 2019;11(1):46.
67. Valtuille L, Paterson I, Kim DH, Mullen J, Sergi C, Oudit GY. A case of lamin A/C mutation cardiomyopathy with overlap features of ARVC: a critical role of genetic testing. *Int J Cardiol.* 2013;168(4):4325-7.
68. Hoss S, Habib M, Silver J, Care M, Chan RH, Hanneman K, et al. Genetic Testing for Diagnosis of Hypertrophic Cardiomyopathy Mimics: Yield and Clinical Significance. *Circ Genom Precis Med.* 2020;13(2):e002748.
69. Xu Y, Li W, Wan K, Liang Y, Jiang X, Wang J, et al. Myocardial Tissue Reverse Remodeling After Guideline-Directed Medical Therapy in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 2021;14(1):e007944.
70. Beauchamp T, Childress J. Principles of Biomedical Ethics: Marking Its Fortieth Anniversary. *Am J Bioeth.* 2019;19(11):9-12.
71. Minkoff H, Ecker J. Genetic testing and breach of patient confidentiality: law, ethics, and pragmatics. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;198(5):498.e1-4.

## 10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 10. 5. 1999. u Zagrebu, u Republici Hrvatskoj. Nakon završetka osnovne škole nastavio sam svoje obrazovanje u Gimnaziji Lucijana Vranjanina u Zagrebu gdje sam uspješno maturirao s odličnim uspjehom 2018. godine. Kao demonstrator djelovao sam u sklopu Katedre za internu medicinu u sklopu nastave Klinička propedeutika. Aktivni sam član Veslačke sekcije Medicinskog fakulteta u Zagrebu, a od 2023. i voditelj sekcije. Od 2022. sam član, a od 2023. u vodstvu Studentske sekcije za kardiologiju s kojom sudjelujem u organizaciji i provedbi interdisciplinarnog projekta “Kuham za svoje srce” i mnogim interaktivnim studentskim radionicama. Kao student aktivno sam sudjelovao na više međunarodnih medicinskih kongresa i simpozija, a neki od njih su: Croatian Student Summit (CROSS), Osijek Student Congress (OSCON), Hrvatski studentski simpozij o bioetici. Aktivno se služim engleskim jezikom.