

# Klinička genomika u funkciji prevencije bolesti i očuvanja zdravlja djece

---

**Bevanda, Anđela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:105:066898>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Anđela Bevanda**

**Klinička genomika u funkciji prevencije bolesti i očuvanja  
zdravlja djece**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2021.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Klinici za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc. dr. sc. Maria Čuka, dr. med. i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2020./2021.

## Popis kratica

AAP - Američka pedijatrijska akademija (*eng. American Academy of Pediatrics*)

ACMG - Američki koledž medicinske genetike (*eng. American College of Medical Genetics and Genomics*)

BCH - Boston Children's Hospital

BRCA - gen raka dojke (*eng. breast cancer gene*)

BTD - biotinidaza

BWH - Brigham and Women's Hospital

CAG – citozin-adenin-gvanin

CES - sekvenciranje kliničkog egzoma (*eng. clinical exome sequencing*)

CGES - sekvenciranje kliničkog genoma i egzoma (*eng. clinical genome and exome sequencing*)

CHOP - Dječja bolnica Philadelphia (*eng. Children's Hospital of Philadelphia*)

CMA – kromosomski mikroaraj (*eng. chromosomal microarray*)

CNV – varijacije broja kopija (*eng. copy number variants*)

COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (*eng. deoxyribonucleic acid*)

ES – sekvenciranje egzoma (*eng. exome sequencing*)

FISH - fluorescentna in situ hibridizacija (*eng. fluorescence in situ hybridization*)

GINA - Genetic Information Nondiscrimination Act

GS – sekvenciranje genoma (*eng. genome sequencing*)

HGMD - Human Gene Mutation Database

HPO – ontologija humanog fenotipa (*eng. Human Phenotype Ontology*)

HZZO - Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

IRB - Institucionalni revizijski odbori (*eng. Institutional Review Boards*)

Kb - kilobaza

LDL – lipoprotein niske gustoće (*eng. low-density lipoprotein*)

MITOMAP - A Human Mitochondrial Genome Database

MRSA - meticilin rezistentan (otporan) *Staphylococcus aureus*

NBS – novorođenački probir (*eng. newborn screening*)

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NGS – sekvenciranje sljedeće generacije (*eng. Next-Generation Sequencing*)

nGS – sekvenciranje genoma novorođenčadi (*eng. newborn genome sequencing*)

NHGRI - National Human Genome Research Institute

NJIL - neonatalna jedinica intenzivnog liječenja

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man

PharmGKB - The Pharmacogenomics Knowledge Base

PSEN - presenilin

RIMGC - Roberts Individualized Medical Genetics Center

RNA-seq - sekvenciranje ribonukleinske kiseline

rWGS – brzo sekvenciranje cijelog genoma (*eng. rapid Whole Genome Sequencing*)

SLCO1B1 - solute carrier organic anion transporter family member 1B1

SNV – varijacija jednog nukleotida (*eng. single nucleotide variants*)

SV – strukturalna varijacija (*eng. structural variation*)

VUS – varijante nepoznatog/neizvjesnog značaja (*eng. variant of uncertain/unknown significance*)

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

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

XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis protein

# Sadržaj

<b>Sažetak</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Genomika u kliničkoj praksi</b> .....	2
<b>3. Zdravstveni doprinos kliničke genomike</b> .....	6
<b>4. BabySeq</b> .....	8
<b>5. CroSeq</b> .....	10
<b>6. Etičke dvojbe vezane uz sekvenciranje genoma djece</b> .....	11
<b>7. Izazovi implementacije genskog sekvenciranja u kliničku praksu</b> .....	13
<b>8. Pogled u budućnost</b> .....	18
<b>Zaključak</b> .....	20
<b>Zahvale</b> .....	21
<b>Literatura</b> .....	22
<b>Životopis</b> .....	29

## Sažetak

Klinička genomika u funkciji prevencije bolesti i očuvanja zdravlja djece

Autor Anđela Bevanda

U ovom preglednom radu predočena je uloga sekvenciranja genoma u unaprijeđenju zdravlja pedijatrijske populacije. Razvojem tehnologije i napretkom znanosti postalo je daleko brže i jeftinije očitati gensku informaciju koju nosi pojedinac. Shodno tomu, ako postoji mogućnost, zašto ne saznati što svaki pojedinac nosi u sebi i sukladno tomu unaprijediti zdravlje i poboljšati kvalitetu života. Posebno je vulnerabilna pedijatrijska populacija koja može profitirati od poznavanja vlastite genske informacije i na taj način osigurati zdravo i sretno djetinjstvo. Na početku ovog rada govorit će se o kliničkoj genomici općenito te njezinoj upotrebi u pedijatriji. Nakon toga bit će objašnjene dobrobiti uvođenja genskog testiranja u kliničku praksu te značaj jednog od prvih većih projekata sekvenciranja genoma kod djece - BabySeq projekta. Osim toga, bit će raspravljena raznovrsna problematika vezana uz sekvenciranje genoma – od etičkih dvojbi do izazova implementacije genskog sekvenciranja u kliničku praksu. Na koncu, rad će dati osvrt na budućnost kliničke genomike.

Ključne riječi: klinička genomika, sekvenciranje genoma, BabySeq, novorođenački probir

# Summary

Clinical genomics as a tool of preventive medicine in pediatric population

Author Anđela Bevanda

This review will try to depict the role of genome sequencing in health improvement among the pediatric population. Following the technological and scientific progress, even reading the genetic information of an individual has become faster and less expensive. Accordingly, if there is an opportunity for genome sequencing, why not use it for health improvement and better life quality. The vulnerable pediatric population would benefit the most out of receiving genetic information that could secure them a healthy and happy childhood. In the beginning of this review, the general definition of clinical genomics and its use in pediatrics will be discussed. Afterwards, the utility of genome sequencing and significance of one of the first bigger project of genome sequencing in children - BabySeq Project will be explained. Aside from that, different issues regarding genome sequencing will be referred – from ethical issues to challenges of implementing genome sequencing in clinical practice. Finally, this review will give an overview of the future of clinical genomics.

Key words: clinical genomics, genome sequencing, BabySeq, newborn screening



# 1. Uvod

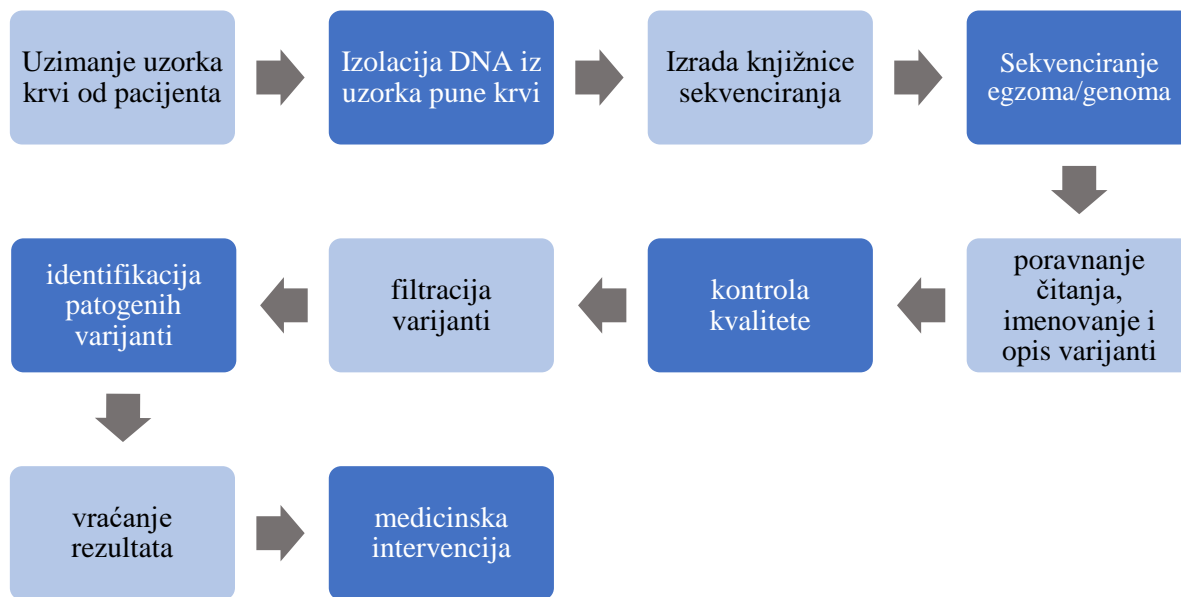
Genomika je već 1970-ih zakoračila u kliničku praksu i dobivala sve veći značaj kroz godine (1). Klinička specijalnost koja se nalazi na čelu usvajanja genske tehnologije u kliničku praksu je pedijatrija – prije skoro 40 godina prihvatila je upotrebu prvog genski proizvedenog proteinskog proizvoda za ljudsku upotrebu - humanog rekombinantnog inzulina (2). U počecima pedijatrija je uvela novorođenački probir koji je postao prvo iskustvo genskog testiranja za većinu populacije. Nakon toga, uvidjevši da su genski poremećaji vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta djece i dojenčadi (3), započeta su ciljana genska testiranja: kariotipizacija, testovi jednog gena, zatim genski paneli te, konačno, sekvenciranje genoma (GS - eng. genome sequencing). Sekvenciranje humanog genoma završeno je 2003. godine te se od tada polako implementira u praksu. Iako se činilo nemoguće unazad 5-10 godina, danas se razmatra uvođenje sekvenciranja genoma kao standardne kliničke opcije. Potonja ideja nailazi na određenu količinu otpora, pogotovo za pedijatrijsku populaciju, no nepobitan je zdravstveni doprinos GS-a. Za primjer možemo navesti slučaj iz 2010. godine (4); dječaka s progresivnom bolešću, nepoznate etiologije, nalik upalnoj bolesti crijeva, koji je morao proći višestruke operacije bez vidljiva poboljšanja. Sekvenciranjem genoma dječaka i njegovih roditelja otkriven je defekt u XIAP genu. To je omogućilo izlječenje transplantacijom matičnih stanica koštane srži. Osim toga, najjednostavniji novorođenački probir može učiniti mnogo za kvalitetu zdravlja pojedinca što se ogleda u pravovremenoj identifikaciji fenilketonurije (5) koja može učiniti nevjerovatnu razliku u odnosu na izostanak istog. Osim dijagnostičke vrijednosti za genske bolesti, sekvenciranje genoma može ponuditi informaciju o tome što se krije u nama te omogućiti preventivno djelovanje i bolju kvalitetu života. Klinička genomika na taj način otvara put prema preventivnoj medicini koja je po svojoj prirodi drugačija od medicine koju poznajemo – ona je proaktivna umjesto reaktivna. Posljedično, otvara put i prema drugim srodnim granama medicine – personaliziranoj i preciznoj medicini. Tri navedena pojma (preventivna, personalizirana i precizna medicina) su međusobno isprepletena i predstavljaju budućnost liječenja odnosno unaprjeđenja zdravlja.

## 2. Genomika u kliničkoj praksi

Jedan od preventivnih programa zdravstvenog sustava koji je značajno unaprijedio zdravlje djece je novorođenački probir (NBS – eng. newborn screening). Probir omogućava pravovremeno otkrivanje i liječenje bolesti što smanjuje morbiditet i mortalitet djece. U zapadnim zemljama svijeta već je odavno pokrenut takav probir (6) dok je u Hrvatskoj počeo 1986. godine kao obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta. Sve do 2017. godine probir se vršio samo za fenilketonuriju i prirođenu hipotireozu spektrofotometrijskom metodom. U 2015. godini usvojen je Nacionalni plan za rijetke bolesti koji uključuje proširenje probira metodom tandemске spektrometrije masa koja omogućuje analizu niza metabolita i postavljanje sumnje na 50 nasljednih poremećaja iz samo jednog isječka suhe kapi krvi na filter papiru. Sukladno tome, 2017. godine, kada je navedena metoda zaživjela, probir se širi na još 6 nasljednih metaboličkih poremećaja - nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca, nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, nedostatak karnitinskog nosača, izovaleričku aciduriju i glutarnu aciduriju tipa I (7). To je velik korak za Hrvatsku, no ona još uvijek zaostaje u usporedbi s drugim zemljama svijeta. Primjer je SAD gdje preporučeni model novorođenačkog probira sadržava 34 osnovna poremećaja i 26 sekundarnih poremećaja obuhvaćajući metaboličke poremećaje, hemoglobinopatije, endokrine poremećaje te druge multisustavne poremećaje (6). S obzirom na dostupnost tandemске spektrometrije u Hrvatskoj postoji mogućnost daljeg proširenja programa probira.

Što se tiče tehnologije genskog testiranja, u počecima bila je dostupna klasična kariotipizacija G-pruganjem kojom se otkrivaju kromosomske aberacije i mozaicizam. Nakon toga, 90-ih godina pojavila se FISH metoda koja je mogla otkriti promjene na submikroskopskoj razini. Nedugo potom, obje potonje citološke metode zamijenio je kromosomski mikroaraj (CMA - eng. chromosomal microarray) koji je često prvi izbor testa u slučaju sumnje na bolest genskog porijekla. Danas je kliničarima na raspolaganju sekvenciranje sljedeće generacije (NGS - eng. Next-Generation Sequencing) koje može sekvencirati cijeli genom (8).

GS predstavlja složen skup biokemijskih i bioinformatičkih procesa (*Shema 1*) kojim se dobiva desetak tisuća (u egzomu) ili milion (u genomu) genskih varijanti koje se potom reduciraju do malog broja varijanti prikladnih za manualnu organizaciju i interpretaciju.



**Shema 1** – Tijek sekvenciranja genoma od uzimanja uzorka krvi do medicinske intervencije (9). Preuzeto i prilagođeno prema: Neu MB, Bowling KM, Cooper GM. (2019).

Proces počinje s biološkim uzorkom (najčešće uzorak pune krvi) iz kojeg se izolira DNA koja se zatim isječe, umnoži i sekvencira generirajući milione kratkih sekvenci koje se onda poravnaju s referentnim genomom. Genske varijante se identificiraju koristeći bioinformatička pomagala koja prepoznaju mjesta na kojima se istraživani uzorak ne podudara s referentnim genomom. Varijante se nakon toga opisuju prema poznatom funkcionalnom učinku ili evolucijskoj povijesti kako bi se mogla utvrditi njihova patogenost i medicinski značaj. Nakon opisa, varijante se računalno reduciraju prema prioritetu do broja prikladnog za rukovanje. Slijedi manualna organizacija kojom se određuje pridonosi li neka varijanta pacijentovu fenotipu te koje varijante vratiti kliničkom timu i pacijentu (9).

Danas se u klinici uglavnom koriste 4 vrste genskog testiranja: genski paneli / testiranje jednog gena, zatim CMA, sekvenciranje cijelog egzoma (WES - eng. whole exome sequencing) i sekvenciranje cijelog genoma (WGS - eng. whole genome sequencing) (*Tablica 1*). Genske panele i testiranje jednog gena nazivamo ciljanim sekvenciranjem - podrazumijeva ispitivanje samo jednog gena ili seta (panela) gena (najčešće 20 - 200) koji se povezuju sa specifičnim poremećajem. Ovo je najisplativija upotreba NGS-a koja uskom selekcijom gena postiže izvrsnu dubinu čitanja.

**Tablica 1** – Opis vrsta testiranja genoma, potencijala za dijagnostički prinos, sposobnosti detekcije te njihovih prednosti i mana (9). Preuzeto i prilagođeno prema: Neu MB, Bowling KM, Cooper GM. (2019).

<b>Vrste testova</b>	<b>Dijagnostički prinos</b>	<b>Detektirane varijante</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Mane</b>
<b>Test jednog gena ili genski panel</b>	~ 20 % *	SNV, indel	Precizna detekcija SNV i indel	Pregled odabranih gena; ovisan o fenotipu
<b>Kromosomski mikroaraj (CMA)</b>	~ 10 %	CNV, SV	Objektivna metoda za detekciju CNV i SV	Ne detektira SNV i indel; niska razlučivost za male CNV
<b>Sekvenciranje cijelog egzoma (WES)</b>	~ 25 %	SNV, indel	Objektivan pregled svih kodirajućih regija	Niska razlučivost za CNV i SV
<b>Sekvenciranje cijelog genoma (WGS)</b>	> 25 %	SNV, indel, CNV	Objektivan pregled kodirajućih i nekodirajućih regija	Visoka cijena, kompleksna interpretacija nekodirajućih regija

*Indel – insercija/delecija; SNV – varijacija jednog nukleotida; SV – strukturalna varijacija; CNV – varijacije broja kopija.*

*\*Ovisno o fenotipu, dijagnostički prinos razlikuje se od poremećaja do poremećaja.*

Važna mana je nemogućnost reanalize rezultata. CMA je preporučen kao test prvog izbora za razvojne poremećaje i kongenitalne anomalije prema važećim smjernicama Američkog koledža medicinske genetike (ACMG - eng. American Academy of Pediatrics) iako je kariotipizacija i dalje aktualna za identifikaciju kromosomskih aberacija (10). CMA je učinkovit za detektiranje varijacija broja kopija u genomu (CNV - eng. copy number variants) - obično velikih delecija ili duplikacija od 200 kb - te ima dijagnostički prinos od ~ 10 % ili više, ovisno o pacijentovu fenotipu. U slučaju da nisu identificirane CNV, testiranje se nastavlja. Za dalje razrješavanje nejasnoća u vidu etiologije bolesti koriste se WES i WGS. WES analizira egzome odnosno dijelove koji kodiraju proteine u približno 20 500 poznatih gena. Postoji i sekvenciranje

kliničkog egzoma (CES - eng. clinical exome sequencing) koje analizira samo 4000 gena koji sadrže varijante povezane s bolešću. Obje metode su kompromis između obuhvata i cijene testiranja. WGS analizira 95 – 98 % cjelokupne ljudske DNA. Time pokriva intronske regije čije mutacije zauzimaju sve veće mjesto na popisu uzroka genskih bolesti.

WGS pronalazi genski uzrok kod približno 25 % prethodno neriješenih kliničkih slučajeva (9). Osim toga, WGS ima bolji dijagnostički prinos u području egzoma te veću osjetljivost pri detekciji CNV (posebno manjih) u usporedbi s WES-om i CMA-om. Izvrstan dijagnostički prinos potvrđen je brojim studijama provedenim kod djece s teškim intelektualnim invaliditetom, neurorazvojnim poremećajem, zastojem u razvoju nepoznate etiologije te kritično bolesne novorođenčadi i djece s ranom infantilnom epileptičkom encefalopatijom (8). Smatra se da će WGS zamijeniti WES jer pokriva sve gene koji su preporučeni za sekvenciranje prema ACMG (11) dok WES pokriva samo 75 % navedenih gena zbog nepotpunog obuhvata egzoma (12). Neke studije već preporučuju WGS kao test prvog izbora (13). Jedina mana GS-a koja još nije razriješena je nedostatna detekcija kromosomskih abnormalnosti (8). Osim dijagnostičke vrijednosti, navedene metode imaju utjecaj na kliničko liječenje koje je promijenjeno na osnovu rezultata WES-a u ~ 17 % , a WGS-a u ~ 27 % slučajeva (14). Uvođenjem WGS-a kao testa prvog izbora smanjili bi se akumulirani troškovi, liječenje započelo ranije te razriješili lažno pozitivni rezultati novorođenačkog probira (česti kod nedonoščadi zbog nerazvijenih organskih funkcija) (15). Osim dijagnostičke funkcije, tu je i preventivna - sigurnije i učinkovitije liječenje kroz poznavanje farmakogenomskih varijanti, bolja kontrola zdravlja ostalih članova obitelji te mogućnost reproduktivnog planiranja.

### 3. Zdravstveni doprinos kliničke genomike

Gensko sekvenciranje posebno je važno u dijagnostici rijetkih bolesti jer skoro 80 % njih čine bolesti genskog porijekla (16). Gensko sekvenciranje ima visoku stopu postavljanja dijagnoze za široku paletu molekularnih uzroka te može skratiti vrijeme od sumnje na bolest do postavljanja dijagnoze (tzv. dijagnostička odiseja) (17). Za pedijatrijsku populaciju s rijetkim bolestima, posebno novorođenčad, skraćenje vremena do postavljanja dijagnoze iznimno je važno jer progresija bolesti može biti vrlo brza. Postoji otprilike 4000 gena čija mutacija izaziva određeni fenotip, od kojih su mnogi eksprimirani u prvih mjesec dana života. Ipak, fenotip se ne mora potpuno manifestirati tijekom prvih dana života zbog čega treba biti na oprezu. Značajan udio pacijenata na odjelima neonatalne jedinice intenzivnog liječenja (NJIL) ima bolest genske etiologije (18). Za pacijente NJIL-a standardno gensko testiranje može biti presporo za optimalno kliničko liječenje. Korištenje genskog sekvenciranja kao testa prve linije bilo bi iznimno korisno, pogotovo kritično bolesnoj novorođenčadi (8). Primjer je brzi WGS (rWGS - eng. rapid Whole Genome Sequencing) koji se pokazao korisnim u neonatalnim i pedijatrijskim jedinicama intenzivnog liječenja jer je dao rješenje za nedijagnosticirane bolesti, doveo do promjene farmakoterapije te omogućio zaobilaženje suvišnih dijagnostičkih i terapijskih postupaka (19). Uz to, stav kliničara i roditelja prema rWGS-u iznimno je pozitivan zbog kliničke i emocionalne koristi koja proizlazi iz same prilike za dobivanje brze dijagnoze za bolesno dijete (20).

Određeni simptomi iziskuju gensko testiranje širokog obuhvata, što samo iznimno veliki genski paneli i WES/WGS mogu postići. Za primjer možemo uzeti gubitak sluha, koji je osnovni simptom 105 nesindromskih te 59 sindromskih oblika gubitka sluha (ukupno 164 „gen-bolest“ para) (21). Također možemo spomenuti Noonanov spektar – skupinu poremećaja koja je karakterizirana varijabilnim dismorfičnim obilježjima, srčanom bolešću, niskim rastom, zaostajanjem u razvoju te hematološkim i onkološkim problemima. NGS genski paneli su najisplativiji i najbrži put do dijagnoze ovog spektra poremećaja sa sposobnošću identifikacije genskog uzroka u 80 % slučajeva (22). Za Noonanov spektar dijagnoza je iznimno važna zbog rizika za rani razvoj onkoloških oboljenja.

Mikrobiološka genetika također čini važan dio kliničke genomike. Postoji šarolika paleta pedijatrijskih stanja u kojima se sumnja na narušenu mikrobiološku ravnotežu crijeva kao ključnu komponentu patogeneze; poput nekrotizirajućeg enterokolitisa, pretilosti i upalnih bolesti crijeva. Osim toga, korištenje genskih tehnologija za brzu molekularnu dijagnozu i

nadzor zaraznih bolesti postaje sve važnije za kliničku skrb i javnozdravstvenu praksu. Za primjer možemo navesti korištenje sekvenciranja genoma mikroorganizama za karakterizaciju ozbiljnog izbijanja MRSA-e u NJIL-u. Takve bi tehnike uskoro mogle postati prva linija epidemioloških istraživanja (23).

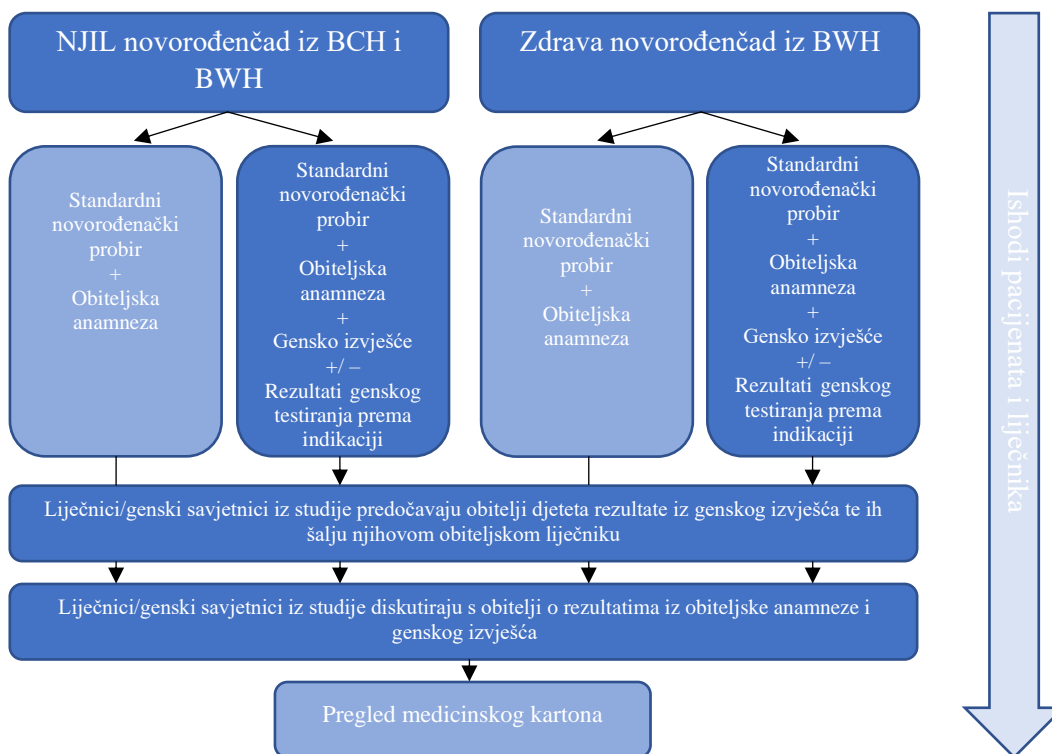
Jedan od svijetlih primjera upotrebe genskog testiranja je sustavni probir dječje populacije u Ujedinjenom Kraljevstvu koji je otkrio monogeniski dijabetes kod 2.5 % pedijatrijske dijabetičke populacije (24). S druge strane imamo neuspjele projekte koji su okarakterizirani kao „previše medicine“ poput masovnog probira dojenčadi na neuroblastom u Japanu koji je trajao od 70-ih godina prošloga stoljeća sve do ranih 2000-ih kada je program zaustavljen (25).

Farmakogenomska testiranja mogu uvelike pomoći u odabiru prikladnog modaliteta liječenja i konačnom ishodu bolesti. Za primjer možemo navesti povezanost između SLCO1B1 rs4149056 genske varijante i miopatije uzrokovane statinima pri čemu bi farmakogenomsko testiranje moglo pomoći. Ipak klinička korist još nije potpuno potvrđena kroz istraživanja. Dva manja istraživanja pokazala su kratkoročno poboljšanje LDL kolesterola nakon SLCO1B1 testiranja pacijenata s intolerancijom na statine. Veća istraživanja dala su dokaze koji bi mogli promijeniti terapijske smjernice za pacijente visokog rizika. No potrebni su dodatni dokazi da bi se opravdalo navedeno testiranje (26).

Osim dobrobiti u vidu liječenja već manifestiranih bolesti, ne treba zaboraviti mogućnost preventivnog djelovanja. Poznajući što nosimo u sebi možemo sukladno promijeniti životne navike; promijeniti prehranu, uvesti redovitu tjelovježbu, odabrati prikladan posao, češće posjećivati liječnika, redovito obavljati probir za onkološke bolesti te posljedično poboljšati kvalitetu života.

## 4. BabySeq

Jedan od pozitivnih primjera upotrebe tehnologije sekvenciranja u pedijatriji je BabySeq projekt. BabySeq projekt je randomizirano kliničko istraživanje čiji je cilj procijeniti medicinski, bihevioralni i ekonomski utjecaj implementacije genskog sekvenciranja u njegu bolesne i zdrave novorođenčadi (27–33). U projektu je sudjelovalo približno 200 novorođenčadi, dio zdravih iz jaslca BWH (Brigham And Women's Hospital) i dio bolesnih iz NJIL-a u BWH i BCH (Boston Children's Hospital). Nasumično su raspodijeljeni u dvije kohorte od kojih je jedna dobila modificirani standard njege (obiteljska anamneza i standardni novorođenački probir) ili modificirani standard njege uz WES (*Shema 2*). Randomizacija, odnosno nasumična raspodjela, omogućila je procjenu medicinskih, bihevioralnih i ekonomskih ishoda studije smanjujući bias nastao volonterskim uključivanjem u studiju. Za one koji su u WES kohorti izrađeno je izvješće koje sadržava patogene ili vjerojatno patogene varijante gena koje su povezane prvenstveno s bolestima čiji je početak u djetinjstvu, ali i u odrasloj dobi ako je na njih moguće djelovati tijekom djetinjstva, te informacije o statusu nositelja i farmakogenomskim varijantama.



**Shema 2** -Pregled dizajna BabySeq studije (28). Preuzeto i prilagođeno prema: Holm IA, Agrawal PB, Ceyhan-Birsoy O, Christensen KD, Fayer S, Frankel LA, et al. (2018). BCH – Boston Children's Hospital; BWH - Brigham And Women's Hospital.



Studija je pokazala (29) da 9,4 % novorođenčadi ima rizik za razvoj bolesti u djetinjstvu koji se nije mogao predvidjeti na osnovu kliničke i obiteljske anamneze; 3,5 % novorođenčadi ima rizik za razvoj bolesti u odrasloj dobi na koji se može djelovati; 88 % novorođenčadi ima status nositelja za recesivnu bolest; te 5 % njih ima značajne farmakogenomske varijante. Rezultati jasno pokazuju da sekvenciranje genoma novorođenčadi (nGS - eng. newborn genome sequencing) učinkovito otkriva rizik za razvoj bolesti te status nositelja za širok spektar poremećaja koji se ne mogu pretpostaviti na osnovu djetetove kliničke slike, obiteljske anamneze i standardnog novorođenačkog probira. Ankete (30) koje su ispunili roditelji i kliničari prije obavijesti o rezultatima studije govore da većina roditelja (71 %) i kliničara (51 %) smatra da je GS korisno za zdravlje, ali su se složili da nosi više rizika (35 %, 70 %) nego standardni novorođenački probir (19 %, 39 %). Sveukupno, roditelji i kliničari imaju više povjerenja u standardni novorođenački probir nego GS, s tim da su roditelji optimističniji nego kliničari u vezi GS-a. Optimizam roditelja najvjerojatnije izvire iz njihovih nerealnih očekivanja vezano uz GS što kliničar treba bolje razjasniti i na taj način pomoći postaviti realnija očekivanja. Problem je i veliki broj obitelji koje su odbile sudjelovati u studiji. Najčešći razlozi odbijanja sudjelovanja su: nedostatak interesa za istraživanje, komplicirana logistika studije, osjećaj preplavljenosti nakon poroda, neugodnost vezana uz sudjelovanje, zabrinutost za privatnost te strah od nesigurnih/nepoželjnih rezultata (31).

Kontekst u kojem se najviše spominje BabySeq studija i sekvenciranje genoma djece je moralno-etički jer se provodi i na zdravoj djeci, ne samo bolesnoj. Primjer iz studije (32,33) postavlja pitanje treba li nešto znati samo zato što imamo priliku saznati. Naime, istraživači su otkrili da je jedno dijete nositelj BRCA2 mutacije usprkos negativnoj obiteljskoj anamnezi što je dovelo do moralnih dvojbi oko vraćanja rezultata jer je studija inicijalno uredila vraćanje samo onih rezultata koji su vezani uz bolesti s početkom u djetinjstvu. Nakon razmatranja, pravila studije su promijenjena - dopušteno je vraćanje rezultata koji su vezani uz bolesti s početkom u odrasloj dobi ako roditelji pristanu na to. BabySeq tim obrazložio je promjenu pravila namjerom da se djeluje u „najboljem interesu djeteta“ jer imajući žive i zdrave roditelje (jer su saznali vlastiti rizik za navedenu mutaciju te provode preventivne mjere) predstavlja podjednaku korist za dijete i obitelj. Preostale etičke dvojbe spomenut ćemo kasnije u radu. Zaključno se može reći da se BabySeq istraživanje pokazalo iznimno korisnim postavljajući temelje za korištenje nGS-a u svakodnevnoj kliničkoj praksi.

## 5. CroSeq

CroSeq je projekt genskog sekvenciranja u nastajanju koji je dio zaklade „Mila za sve“ (34). Zaklada „Mila za sve“ dodjeljuje pomoć malim pacijentima s teškim oboljenjima čije liječenje nije moguće u Hrvatskoj, HZZO ga ne može platiti ili se terapija ne provodi u Hrvatskoj. Svrha CroSeq (Croatian genom biobank/database) projekta je sekvenciranje hrvatskog genoma djece i obitelji sa stvaranjem baze podataka. U sklopu projekta radit će se WGS - trio analize djece i roditelja. U prvoj godini planirano je obraditi genom 350-ero djece, odnosno više od 1000 uzoraka. Projekt će biti ostvaren u suradnji s Harvardom i Oxfordom čiji će stručnjaci pomoći u edukaciji hrvatskog tima stručnjaka. Konačni cilj projekta izrada ja genske mape i liječenje djece genskim editiranjem, dok je primarni cilj edukacija tima stručnjaka, postavljanje dijagnoze za pedijatrijske pacijente i postizanje bolje kvalitete života djece i roditelja.

Osim potonjeg projekta Hrvatska polako, ali sigurno, korača prema personaliziranoj medicini za svoje građane. U srpnju 2019. godine potpisan je Memorandum o suradnji između Vlade Republike Hrvatske i društva Roche d.o.o. o pripremi i provedbi projekta personalizirane medicine u onkologiji s ciljem poboljšanja ishoda bolesti (35).

## 6. Etičke dvojbe vezane uz sekvenciranje genoma djece

Etička pitanja sveprisutna su pri suradnji genetike i pedijatrije. Iako etičke dvojbe postoje i kod testiranja odraslih, puno ozbiljnije su kad je u pitanju pedijatrijska populacija zbog djetetove nemogućnosti donošenja samostalnih odluka. Prava vezana uz genske informacije su „pravo na neznanje“ te „pravo djeteta na otvorenu budućnost“ koje proizlazi iz prvog (36). „Pravo na neznanje“ implicira da su specifične osobe, poput zdravstvenih djelatnika, dužne zadržati određenu informaciju od osoba koje su izričito zatražile da im se spomenuta informacija ne prenese. „Pravo djeteta na otvorenu budućnost“ postoji kako bi se održalo pravo na neznanje u trenutku kada djeca postanu odrasle osobe ili dovoljno zreli za donošenje odluke o vlastitim genskim rezultatima. Primarni argument protiv genskog testiranja djece odnosi se na dječje "pravo na otvorenu budućnost". Kako je već spomenuto, to pravo tvrdi da se autonomija buduće odrasle osobe krši kad drugi nepovratno odluče otkriti prediktivne genske informacije tijekom djetinjstva. Ipak, prema Gerrettu (37), interes djece za otvorenu budućnost ne treba shvatiti kao pravo. Otvorena budućnost jedan je od važnih interesa koji se treba mjeriti s drugim jednako važnim interesima prilikom donošenja odluka. Dakle, prediktivno gensko testiranje u načelu je etički dopušteno, sve dok promovirani interesi prevladavaju potencijalnu štetnost.

Povrat informacija o sekundarnim ili slučajnim nalazima genskog testiranja pacijenata pedijatrijske dobi diskutabilan je zbog potencijalnog negativnog učinka na dijete i obitelj, dok za odrasle nije nađen ili je zanemariv negativan utjecaj nakon primanja informacije (38). Iako se smatraju sinonimima, slučajni nalazi genskog testiranja su medicinski značajni nalazi koji su otkriveni nenamjerno dok su sekundarni nalazi medicinski značajni nalazi koji traženi s namjerom, ali nisu povezani s primarnom motivacijom zbog koje je načinjeno sekvenciranje genoma. Debate o vraćanju informaciju otvorile su se nakon objave službenih preporuka ACMG-a koje se zalažu za povrat svih genskih informacija, uključujući i one koje nisu tražene (39). Protivnici preporuka naveli su moguću psihosocijalnu štetnost koja dolazi uz saznanje o mogućnosti razvoja bolesti u budućnosti, pogotovo u svjetlu odnosa prema djetetu unutar obitelji – odnos prema djetetu kao da je već bolesno. Osim toga navode i već spomenuto pravo na otvorenu budućnost koje se ne bi smjelo zanijekati niti jednom djetetu. Posljedično, ACMG je promijenio svoje preporuke uključivši opciju odbijanja informiranja o rezultatima testiranja (11,40). Prilikom prenošenja informacije o sekundarnim ili slučajnim nalazima genskog sekvenciranja djeteta možemo se etički orijentirati na dva osnovna načina – „korist obitelji“

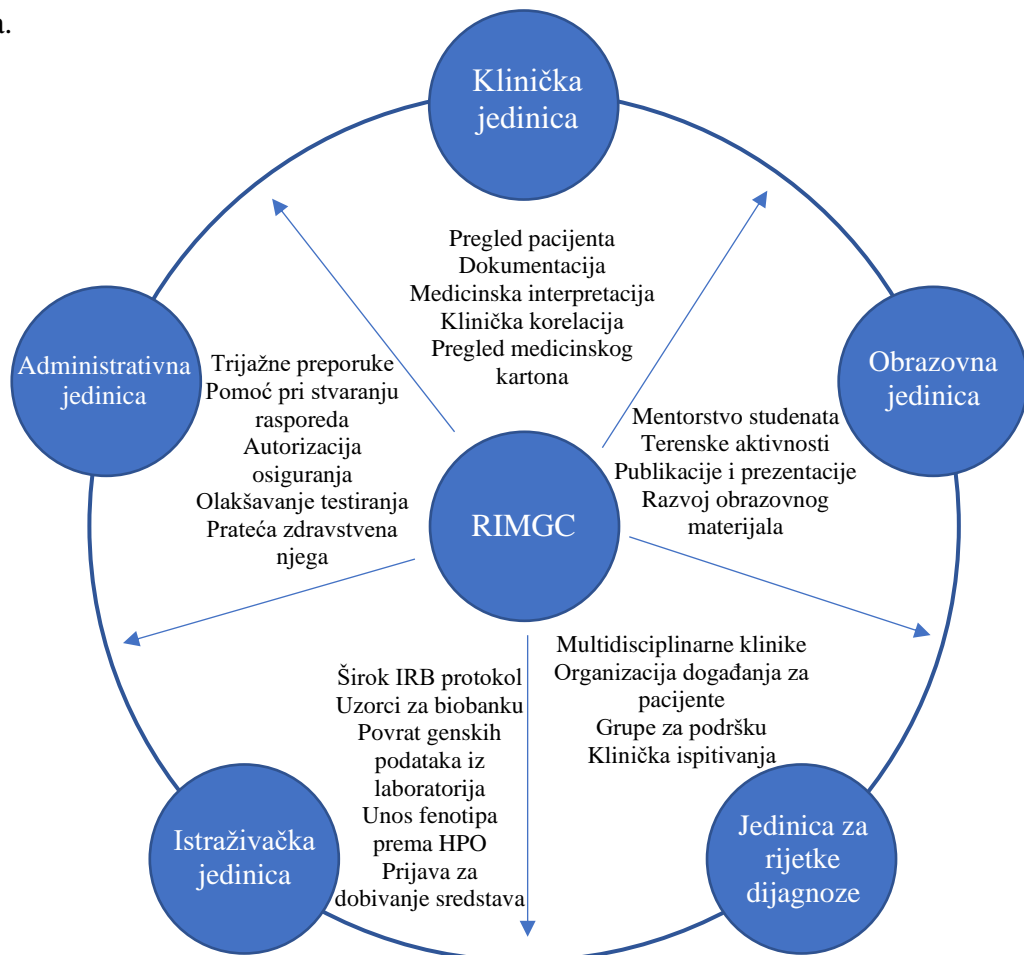
(41) ili „autonomija djeteta“ (42). „Korist obitelji“ podržava vraćanje svih informacija sekvenciranja obitelji jer mogu biti od velike koristi za najbližu obitelj (npr. onkološki rizik za roditelje), dok „autonomija djeteta“ podržava pravo djeteta na samostalnu odluku kad postane punoljetno. Svaka obitelj će odabrati svoj model djelovanja, na kliničaru je samo da spriječi odluke koje bi mogle štetiti djetetu. Pozitivan je primjer testiranje djeteta na Huntingtonovu bolest nakon što je ustanovljena kod njegova djeda i oca, što nije uznemirilo skrbnike i dijete, niti ograničilo budućnost djeteta, već dalo mogućnost za svjesno planiranje budućnosti te razriješilo nesigurnost uzrokovanu neznanjem (37).

Kako bi se razriješile etičke dvojbe, uputno je raditi na izradi kvalitetnih smjernica koje mogu postati moralni kompas pri donošenju odluka. Za primjer možemo uzeti smjernice za gensko testiranje djece prema Američkoj pedijatrijskoj akademiji (AAP - eng. American Academy of Pediatrics) (43):

- a) odluka o provedbi sekvenciranja genoma donosi se u najboljem interesu djeteta uz obvezno gensko savjetovanje i informirani pristanak roditelja i djeteta ako je moguće;
- b) provođenje NBS-a se preporučuje uz opciju odbijanja postupka;
- c) testiranje za status nositelja kod djece se ne preporučuje ako ne donosi zdravstvenu dobrobit u djetinjstvu;
- d) prediktivno gensko testiranje kod asimptomatske djece provodi se za bolesti s početkom u djetinjstvu uz dopuštenje skrbnika, dok se za bolesti s početkom u odrasloj dobi provodi samo ako se na bolest može djelovati u djetinjstvu ili neznanje o dijagnozi predstavlja preveliko psihosocijalno breme za obitelj;
- e) testiranje tkivne podudarnosti kod maloljetnika dopušteno je ako se čini na korist uže obitelji;
- f) preporučuje se informiranje djeteta o njegovome genskom statusu sukladno njegovoj zrelosti te poštivanje svjesne odluke adolescenta vezano uz njegovu gensku informaciju;
- g) liječnici imaju obvezu obavijestiti skrbnike o implikacijama koje gensko testiranje djeteta ima za ostale članove obitelji te ih potaknuti na dijeljenje informacije s ostatkom obitelji;
- h) ne preporučuje se korištenje komercijalnih genskih testova.

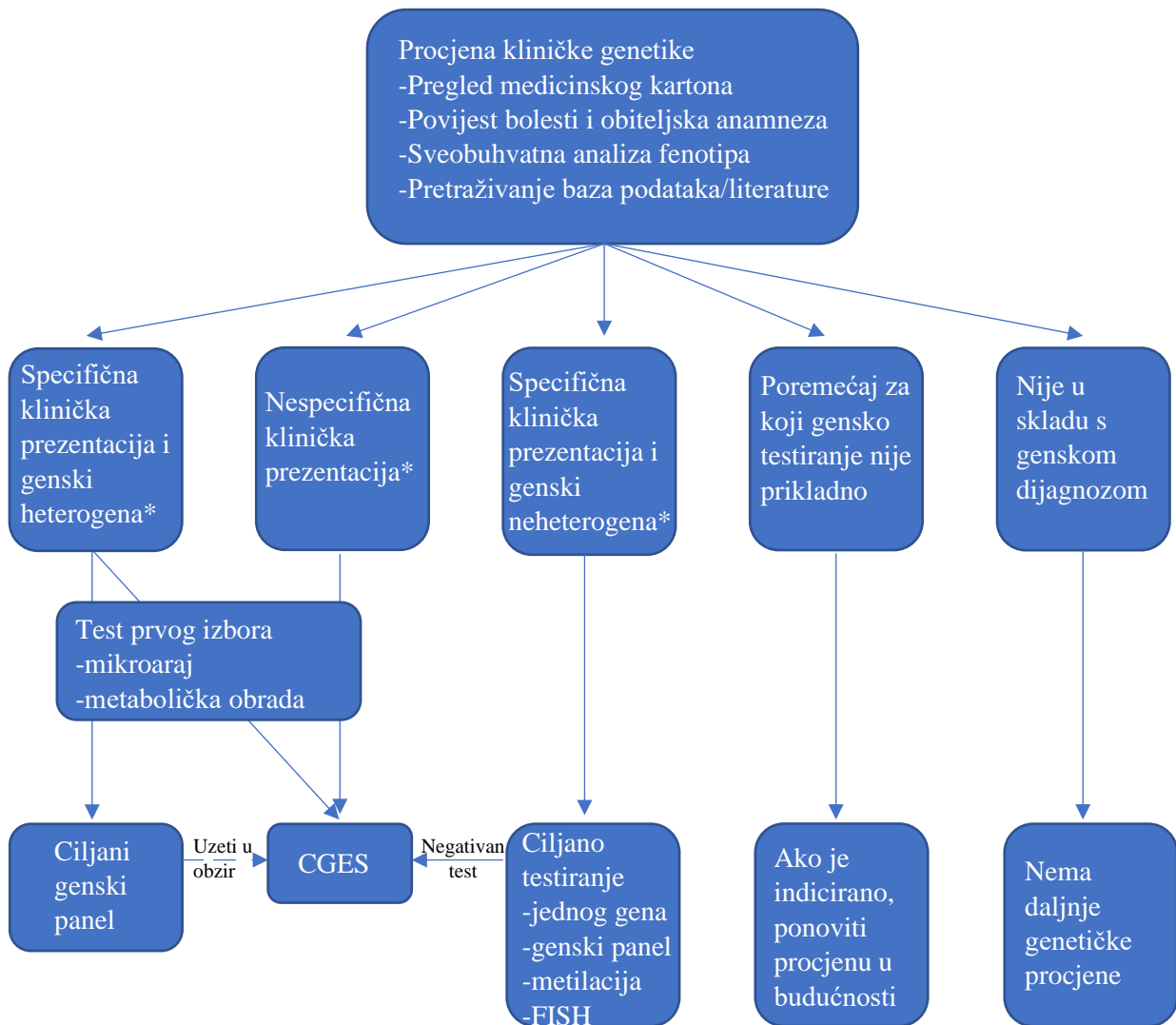
## 7. Izazovi implementacije genskog sekvenciranja u kliničku praksu

Kamen spoticanja za širu kliničku primjenu sekvenciranja genoma je, između ostaloga, problem implementacije u trenutni zdravstveni sustav. Ipak, idejnih rješenja ne nedostaje - primjer za to je model RIMGC-a (Roberts Individualized Medical Genetics Center) (44) nastao u sklopu Dječje bolnice Philadelphia (CHOP - Children's Hospital of Philadelphia). RIMGC model karakterizira praktičan i centraliziran pristup pružanja genskih usluga svojim pacijentima. Služi kao most između genomike i svih ostalih kliničkih grana. Podijeljen je u više djelatnih jedinica: kliničku, obrazovnu, istraživačku, administrativnu te jedinicu za rijetke dijagnoze (*Shema 3*). Svaka jedinica aktivno olakšava inkorporaciju genomike u postojeći zdravstveni sustav. Takav model može biti uzor za buduće projekte na polju genomike na našim prostorima.



**Shema 3** - Pregled RIMGC infrastrukture. Prikazan je opis podjedinica i organizacija (44). Preuzeto i prilagođeno prema Biswas S, Medne L, Devkota B, Bedoukian E, Berrodin D, Izumi K, et al. (2020). IRB - institucionalni revizijski odbori (eng. Institutional Review Boards) ; HPO – ontologija humanog fenotipa (eng. Human Phenotype Ontology).

Važan korak integracije je identifikacija pacijenata prikladnih za gensko testiranje, posebno WES/WGS, jer se u početcima ono neće moći provoditi na svim pacijentima. To mogu olakšati preporuke odnosno algoritmi (*Shema 4*) za identificiranje pacijenata koji će najvjerojatnije imati koristi od sekvenciranja kliničkog genoma i egzoma (CGES - eng. clinical genome and exome sequencing) (45).



**Shema 4** - Algoritam za pomoć u identifikaciji pacijenata koji će najvjerojatnije imati koristi od sekvenciranja kliničkog genoma i egzoma (CGES) (45). Preuzeto i prilagođeno prema: Bowdin S, Gilbert A, Bedoukian E, Carew C, Adam MP, Belmont J, et al. (2016). Genetička ispitivanja trebala bi biti vođena fenotipom, uzimajući u obzir najnovije znanje o genskoj osnovi ispitivanog poremećaja. Odluka o provođenju CGES-a umjesto ciljanog genskog panela donosi se na osnovu genske heterogenosti stanja, obuhvata gena od interesa testom te cijene testa. \*CGES se smatra testom prvog izbora kada postoji konsangvinitet roditelja.

Osim same implementacije u zdravstvo, postoje problemi interpretacije nalaza GS-a. Za lakšu interpretaciju nalaza razvijene su mnoge baze genskih podataka. Primjer je HGMD (eng.

Human Gene Mutation Database) koju čini sveobuhvatna kolekcija objavljenih germinativnih mutacija jezgrenih gena koje su vezane s nasljednim bolestima. Ona predstavlja objedinjeno spremište naslijeđenih mutacija koje su uzrok ljudskih genskih bolesti i koje širom svijeta koriste istraživači, kliničari, dijagnostički laboratoriji i genski savjetnici, a važan je alat za anotaciju rezultata NGS-a. Baza je slobodno dostupna registriranim korisnicima iz akademskih institucija i neprofitnih organizacija. HGMD ne pokriva somatske i mitohondrijske mutacije, niti farmakogenomske varijante. One su dobro obuhvaćene drugim bazama poput COSMIC (eng. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer), MitoMap (eng. A Human Mitochondrial Genome Database) i PharmGKB (eng. The Pharmacogenomics Knowledge Base) (46). Vrijedno je spomenuti i baze poput ClinVar (47). ClinVar je arhiva otvorenog pristupa u sklopu NCBI-a (eng. National Center for Biotechnology Information) koja služi interpretaciji kliničkog značenja varijanti za prijavljene poremećaje. Uključuje germinativne i somatske varijante svih veličina, vrsta i genskih lokacija. Interpretacije prijavljuju klinički laboratoriji za testiranje, istraživački laboratoriji te lokus specifične baze podataka poput OMIM-a (eng. Online Mendelian Inheritance in Man). U slučaju da prikladna interpretacija nije pronađena, ne treba zaboraviti da je GS trajan dijagnostički alat koji se ne će promijeniti kroz vrijeme (genom je isti cijeloga života), no razumijevanje varijanti hoće, stoga vršenjem periodične reanalize nalaza možemo saznati značaj nepoznatih genskih varijanti. Korist reanalize pokazala se u mnogim studijama (48–51). Rutinska reanaliza rezultata kroz vrijeme može značajno poboljšati dijagnostički obuhvat, čak s 27 % na 40 % (51). Upravo je to vrijednost GS-a i prednost pred drugim dijagnostičkim metodama. Kako tehnologija napreduje, reanaliza starijih podataka vjerojatno će ostati bitna, no treba obratiti pozornost na nove tehnologije sekvenciranja i njihov potencijal.

Kako bi se navedene baze podataka mogle redovito obnavljati i unaprjeđivati, potrebni su znanstveni dokazi – ne postoji prečac za provođenje istraživačkih studija. Neki pristupi mogu ubrzati ovaj proces: suradnja, razmjena podataka, obrazovanje javnosti i kliničara, upotreba elektroničkih zdravstvenih kartona te novi model zdravstvenog sustava koji genomiku integrira u medicinu temeljenu na dokazima; no ne mogu zamijeniti klinička istraživanja. S nedavnim povećanjem broja komercijalnih genskih testova, potreba za dokazima u genetici važnija je nego ikad. Da bi medicinska genetika poboljšala zdravlje stanovništva, potrebni su jasni dokazi za procjenu analitičke valjanosti, kliničke valjanosti i kliničke koristi genskih testova te implementaciju genomike u kliničko okruženje (52). Nužno je sekvencirati što više genoma kako bismo imali pouzdanije informacije o značenju različitih genskih varijanti. Uz svaki novi sekvencirani genom možemo otkriti nešto novo. Za primjer možemo navesti otkrivanje nove

varijante BTB gena u sklopu BabySeq studije te označavanje varijante kao „vjerojatno patogene“ na osnovu genotipske informacije i biokemijskog fenotipa što je otklonilo jednu od mnogobrojnih varijanti nepoznatog značaja (VUS - eng. variant of uncertain/unknown significance) i pomoglo boljoj interpretaciji GS-a (53).

Jedna od prepreka implementacije genskog testiranja u kliničku praksu dugo godina bila je njegova cijena. Ipak, situacija se mijenja jer su istraživanja pokazala da će njegovo uključanje u zdravstvenu njegu smanjiti ukupnu cijenu zdravstvene njege (54). Podatci o cijeni implementacije WGS-a u zdravstvenu njegu iz 2015. godine navode cijenu od približno 5000 američkih dolara (55). Prema recentnim podacima, cijena visokokvalitetnog nacrtaja cijelog humanog genoma iznosi približno 1000 američkih dolara (56) ili čak manje od 1000 dolara (57). Osim cjenovnog poboljšanja, došlo je i do poboljšanja brzine provedbe sekvenciranja. Koristeći trenutno dostupnu tehnologiju moguće je sekvencirati genom za nekoliko dana ili sati (57).

Komunikacijski izazovi koji se nalaze pred liječnicima koji priopćavaju rezultate genskog testiranja pacijentima i njihovim obiteljima jedan su od problema koji se često previde. Opaženo je da se liječnici (negenetičari) ne snalaze u terminologiji koju koristi genomika, da im obujam i kompleksnost informacija stvaraju poteškoće te da imaju problema s predočavanjem kompleksnih rizika testiranja svojim pacijentima što nas upućuje na potrebu dodatne edukacije u području genomike (58). Prikladna edukacija svih liječnika nužna je jer budućnost medicine zahtijeva kvalitetno znanje genomike. Za sprječavanje nesporazuma pri informiranju obitelji, treba objasniti sve mogućnosti i postaviti realna očekivanja. Roditelje valja upozoriti na mogućnost da nakon sekvenciranja ne dobiju željenu informaciju, a dobiju neočekivanu informaciju ili informaciju nepoznatog značenja. Osim toga, važno je objasniti značenje „negativnog“ genskog testiranja koje ne znači isto kao kod drugih testova – odsutnost patogenih varijanti nije 100 %-tna, postoji mogućnost da se određena varijanta previdjela. Umjesto promatranja rezultata kao definitivnih tvrdnji, bolje ih je smatrati kao prikaz potencijalnih genetskih mutacija - što je ujedno snaga i slabost ovoga testa (59).

Važno pitanje je kako se odnositi prema nalazu statusa nositelja patološke varijante gena kod djeteta. Recentne profesionalne smjernice uglavnom ne podržavaju povrat informacije o statusu genskog nositelja za dojenčad i djecu (27). Kao razlozi navode se: manjak neposredne koristi informacije, oprez zbog potencijalne štetnosti informacije te zaštita autonomije djeteta. Nedavne studija, BabySeq projekt (28), navodi razloge za i protiv povrata informacije o statusu genskog nositelja te poteškoće vezane uz sam proces povrata informacije. Pokazano je da > 90



% dojenčadi ima barem jednu varijantu statusa nositelja (27). Kao korist vraćanja rezultata o statusu nositelja navodi se mogućnost postupnog upoznavanja s poremećajem za koje je dijete nositelj te mogućnost svjesnijeg planiranja obitelji uzimajući u obzir rizik začeca djeteta koje ima status nositelja. Nasuprot tome, kao potencijalna štetnost vraćanja rezultata navodi se nerazumijevanje genske informacije koje može dovesti do straha kod primatelja i njegovih roditelja te diskriminacije u društvu što je riješeno prikladnom edukacijom primatelja te zaštitom osobnih podataka. Osim toga, spomenuti su dodatni izazovi povrata informacija: povrat statusa nositelja za bolesti s nastupom u odrasloj dobi (npr. patogeni BRCA1 i BRCA2), ograničen obuhvat GS-a (loš za detekciju strukturalnih varijanti i ekspanzije trinukleotidnih ponavljanja), interpretacija VUS te dostupnost i cijena kaskadnog testiranja (testiranje roditelja nakon spoznaje o statusu nositelja kod djeteta). Između ostaloga, kliničari trebaju biti oprezni pri povratku informacija kako ne bi pretjerano ustrašili obitelj govoreći o potencijalnom razvoju bolesti do kojeg možda neće ni doći. Primjer takve situacije je prisutnost genotipa koji je karakterističan za bolest, no ne i odgovarajućeg fenotipa što se naziva smanjenom ili nepotpunom penetrantnošću (60). Važno je naglasiti da veliku ulogu pri odabiru vraćanja rezultata ima mogućnost djelovanja na bolest. Tako se vraćanje BRCA mutacija smatra opravdanim jer je moguće djelovati na ishod bolesti, dok se vraćanje PSEN mutacije ili abnormalne ekspanzije CAG ne smatra opravdanim jer još uvijek nema učinkovitog liječenja za Alzheimerovu i Huntingtonovu bolest (9). Suprotno tome, ranije smo spomenuli testiranje djeteta za Huntingtonovu bolest koje je imalo isključivo pozitivan učinak na pacijenta i obitelj. Sveukupno, nema smjernica koje odgovaraju svim pacijentima, pa svakom pacijentu i njegovoj obitelji treba pristupiti individualno.

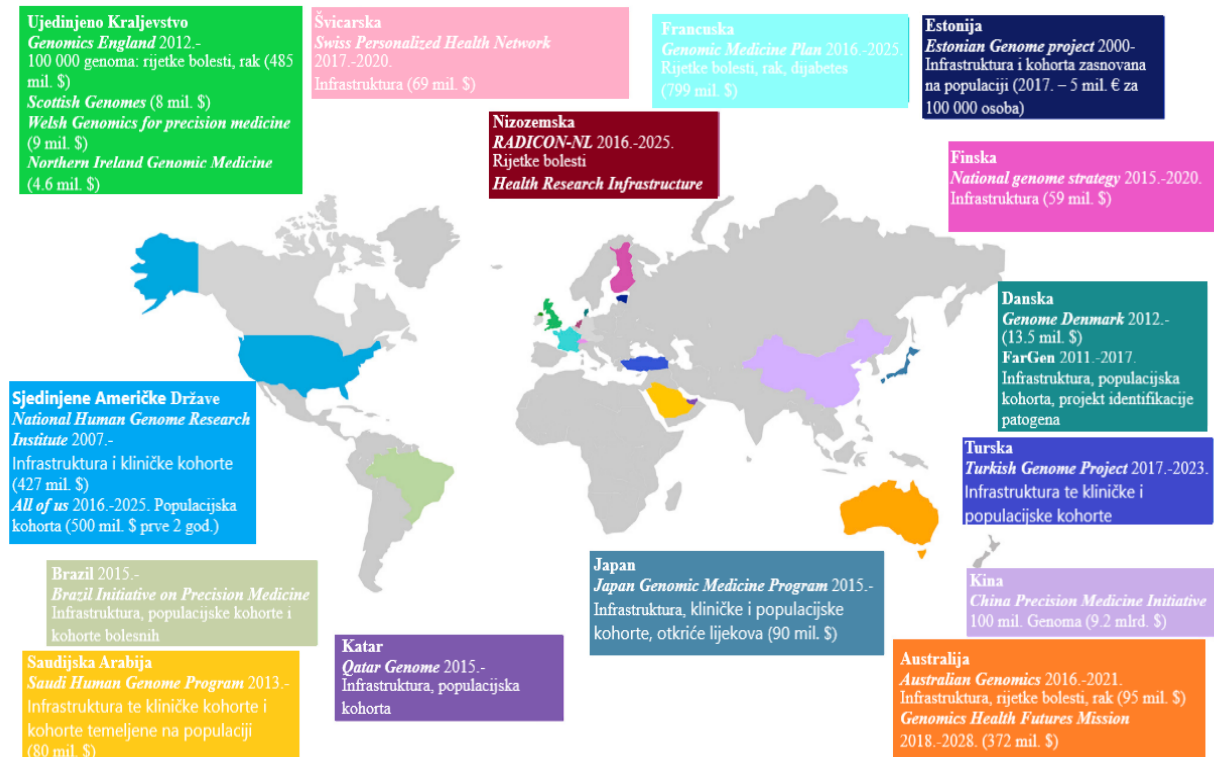
Još jedna briga vezana uz GS je zaštita privatnosti genske informacije te diskriminacija zdravstvenih osiguravatelja na osnovu genske informacije korisnika. Različite zemlje su se različito postavile u pogledu ovog problema. Loš primjer predstavlja SAD gdje postoji pravni statut GINA (eng. Genetic Information Nondiscrimination Act), no on ne štiti sve genske informacije; ne uključuje manifestirana genska oboljenja, ne pokriva životno i invalidsko osiguranje, male obrte i sl. Posljedično, osiguravajuće kuće mogu zahtijevati odavanje genske informacije pri sklapanju ugovora. S druge strane imamo Francusku i Kanadu gdje je genska informacija jako dobro zaštićena i rezultati genskog testiranja smiju se koristiti samo u medicinske i znanstvene svrhe. Osim toga, imamo primjer kompromisa između prethodno navedenih opcija kod Švicarske, Ujedinjenog Kraljevstva i Australije gdje se rezultati genskog testiranja ne smiju koristiti za određivanje opsega zdravstvenog osiguranja osim ako se radi o osiguranju iznad određenog financijskog limita (61). Što se tiče područja Europe općenito,

Vijeće Europe je 2008. godine usvojilo dodatni protokol o Genskom testiranju u zdravstvene svrhe u sklopu Konvencije o ljudskim pravima i biomedicini (62) koji je postao temelj za zakone većine europskih država.

## 8. Pogled u budućnost

Kako napreduje genska tehnologija tako se rađa sve više projekata genskog sekvenciranja. Jedan od projekata koji će omogućiti bolje razumijevanje i interpretaciju nalaza genskog sekvenciranja je „All of Us“ istraživački projekt započet u SAD-u 2018. godine. Cilj je projekta okupiti što veću (barem milion) i što raznolikiju (svih rasa, etničkih skupina, dobi, spola, obrazovanja, primanja, načina življenja) skupinu sudionika te prikupiti njihove zdravstvene i sociodemografske podatke te biološke uzorke. Od projekta se očekuje korist u procjeni ishoda bolesti te učinka lijekova i drugih terapijskih opcija u različitom okolišnom, socijalnom, genomskom i ekonomskom kontekstu što bi trebalo poboljšati zdravlje populacije (63).

Osim SAD-a, i ostatak svijeta polako se otvara za GS čemu u prilog govore mnogi nacionalni programi za medicinsku genomiku (64). Neke od tih zemalja su Ujedinjeno Kraljevstvo, Francuska, Australija, Saudijska Arabija i Turska koje razvijaju infrastrukturu i vrše gensko sekvenciranje za rijetke bolesti i tumore; zatim SAD, Estonija, Danska, Japan, i Katar koje imaju projekte sekvenciranja na razini populacije; te Švicarska, Nizozemska, Brazil i Finska koji se primarno fokusiraju na razvoj infrastrukture za GS (*Slika 1*). Ne treba izostaviti najveći projekt – „China Precision Medicine Initiative“, 15-ogodišnji projekt koji će sekvencirati 100 000 000 genoma do 2030. godine.



**Slika 1-** Karta trenutno aktivnih državno financiranih nacionalnih inicijativa za medicinsku genomiku (64). Preuzeto i prilagođeno prema: Stark Z, Dolman L, Manolio TA, Ozenberger B, Hill SL, Caulfield MJ, et al. (2019).

Usprkos povećanju dijagnostičkog prinosa koje je omogućilo gensko sekvenciranje, približno 50 - 65 % kliničkih slučajeva suspektne genske etiologije ostaje neriješeno (9). Kao dodatak GS-u, uvode se komplementarne strategije sekvenciranja u kliničkoj praksi. Primjer za to je sekvenciranje RNA (RNA-seq), koje je, prema istraživanju, dalo odgovor na 36 % slučajeva negativnog nalaza GS-a (65). RNA sekvenciranje otvara vrata transkriptomike koja istražuje ekspresiju gena – ona može u potpunosti promijeniti izraz genske informacije te posljedično izgled bolesti. Osim potonjeg, razvijaju se proteomika (proučava sve proteine koje organizam proizvodi), epigenomika (proučava epigenetske modifikacije genskog materijala stanice) i ostali „Omiksi“ (discipline sa sufiksom -omika) za koje se očekuje značajan dijagnostički prinos kod neriješenih kliničkih slučajeva.

## Zaključak

Klinička genomika je polako, ali sigurno, postala aktualna tema medicine te vodič za budućnost medicine. Uključenje genskog sekvenciranja u rutinsku kliničku praksu nije u potpunosti zaživjelo, no svakako se bliži. Znanost napreduje brzo što se ogleda u naglom povećanju dostupnosti genskog testiranja. Naravno, to donosi mnoge izazove, od problema integracije u zdravstveni sustav, interpretacije nalaza, predočavanja nalaza pacijentima do psihosocijalnih posljedica. Bez obzira na izazove, važno je naglasiti da implementacija kliničke genomike u svakodnevnu kliničku praksu donosi više dobrobiti nego štete. Pacijenti i njihove obitelji mogu saznati što nose u sebi te sukladno tomu djelovati: psihičkom pripremom za budućnost u slučaju da djelotvorna terapija ne postoji ili drugačijim životnim izborima u slučaju da se bolest može spriječiti ili izliječiti ako se dijagnosticira na vrijeme. Istini na volju, vijest o prisutnosti BRCA mutacije kod novorođenog djeteta može izazvati velik stres kod obitelji, no to nije opravdan razlog za prešućivanje navedene informacije znajući da se na bolest može djelovati. I onda kada se ne može djelovati, odgovor na pitanje „zašto?“ može pružiti mir obitelji oboljelog djeteta. S obzirom na evidentne koristi GS-a, u budućnosti možemo očekivati potpunu implementaciju GS-a u kliničku praksu; najprije za kritično bolesne te kasnije za svu djecu. Klinička genomika ulijeva nadu u bolje sutra kada ćemo moći spriječiti, pravovremeno otkriti i izliječiti sve bolesti poznajući genom, epigenom, transkriptom, metabolom i mikrobiom. To će otvoriti novu eru biomedicine koja je personalizirana i precizna.

## **Zahvale**

Zahvaljujem doc. dr. sc. Mariu Ćuku, dr. med. na povjerenju, stručnom vodstvu, savjetima i pomoći pri izradi ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojim roditeljima na njihovoj bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju su mi dali kroz cijelo školovanje. Posebno im hvala na vjeri u mene u trenucima kada sam ju ja izgubila.

Velika hvala mome bratu blizancu koji je uvijek bio tu da me motivira, nasmije i podsjeti na ono što je važno.

## Literatura

1. Lalonde E, Rentas S, Lin F, Dulik MC, Skraban CM, Spinner NB. Genomic Diagnosis for Pediatric Disorders: Revolution and Evolution. Vol. 8, *Frontiers in Pediatrics*. Frontiers Media S.A.; 2020.
2. Quianzon CC, Cheikh I. History of insulin. *J Community Hosp Intern Med Perspect*. 2012;2(2):18701.
3. Martin JA, Hamilton BE, Osterman MJKS. Births in the United States, 2013 Key findings Data from the National Vital Statistics System. 2013.
4. Worthey EA, Mayer AN, Syverson GD, Helbling D, Bonacci BB, Decker B, et al. Making a definitive diagnosis: Successful clinical application of whole exome sequencing in a child with intractable inflammatory bowel disease. *Genet Med*. 2011;13(3):255–62.
5. Blau N. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Hum Mutat*. 2016;37(6):508–15.
6. Weismiller DG. Expanded Newborn Screening: Information and Resources for the Family Physician. Vol. 95, *American family physician*. 2017. p. 703–9.
7. Bilandžija I, Barić I, Škaričić A, Zekušić M, Križić I, Ramadža D. Program proširenog novorođenačkog probira Republici Hrvatskoj - zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi. *Paediatr Croat*. 2018;62(Supl 1):10–4.
8. Bick D, Jones M, Taylor SL, Taft RJ, Belmont J. Case for genome sequencing in infants and children with rare, undiagnosed or genetic diseases. Vol. 56, *Journal of Medical Genetics*. 2019. p. 783–91.
9. Neu MB, Bowling KM, Cooper GM. Clinical utility of genomic sequencing. *Curr Opin Pediatr*. 2019;31(6):732–8.
10. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901–9.
11. Watson MS. ACMG policy statement: Updated recommendations regarding analysis and reporting of secondary findings in clinical genome-scale sequencing. Vol. 17, *Genetics*

- in Medicine. Nature Publishing Group; 2015. p. 68–9.
12. Meienberg J, Bruggmann R, Oexle K, Matyas G. Clinical sequencing: is WGS the better WES? *Hum Genet.* 2016;135(3):359–62.
  13. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med.* 2018;20(4):435–43.
  14. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White SM, Dimmock D, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *npj Genomic Med.* 2018;3(1):16.
  15. Berg JS, Agrawal PB, Jr BB, Beggs AH, Steven E. Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health. *Pediatrics.* 2017;139(2).
  16. RARE Facts - Global Genes [Internet]. [Pristupljeno 30. ožujka 2021]. Dostupno na: <https://globalgenes.org/rare-facts/>
  17. Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: Time to address gaps in care. Vol. 89, *Clinical Genetics.* 2016. p. 275–84.
  18. Petrikin JE, Willig LK, Smith LD, Kingsmore SF. Rapid whole genome sequencing and precision neonatology. *Semin Perinatol.* 2015;39(8):623–31.
  19. Sanford EF, Clark MM, Farnaes L, Williams MR, Perry JC, Ingulli EG, et al. Rapid Whole Genome Sequencing Has Clinical Utility in Children in the PICU\*. *Pediatr Crit Care Med.* 2019;20(11):1007–20.
  20. Hill M, Hammond J, Lewis C, Mellis R, Clement E, Chitty LS. Delivering genome sequencing for rapid genetic diagnosis in critically ill children: parent and professional views, experiences and challenges. *Eur J Hum Genet.* 2020;28(11):1529–40.
  21. DiStefano MT, Hemphill SE, Oza AM, Siegert RK, Grant AR, Hughes MY, et al. ClinGen expert clinical validity curation of 164 hearing loss gene–disease pairs. *Genet Med.* 2019;21(10):2239–47.
  22. Lee BH, Yoo H-W. Noonan syndrome and RASopathies: Clinical features, diagnosis and management. *J Genet Med.* 2019;16(1):1–9.

23. Feero WG, Guttmacher AE. Genomics, personalized medicine, and pediatrics. Vol. 14, *Academic Pediatrics*. 2014. p. 14–22.
24. Shepherd M, Shields B, Hammersley S, Hudson M, McDonald TJ, Colclough K, et al. Systematic population screening, using biomarkers and genetic testing, identifies 2.5% of the U.K. pediatric diabetes population with monogenic diabetes. *Diabetes Care*. 2016;39(11):1879–88.
25. Katanoda K. Neuroblastoma mass screening-What can we learn from it?. Vol. 26, *Journal of Epidemiology*. Japan Epidemiology Association; 2016. p. 163–5.
26. Vassy JL, Chun S, Advani S, Ludin SA, Smith JG, Alligood EC. Impact of SLCO 1B1 Pharmacogenetic Testing on Patient and Healthcare Outcomes: A Systematic Review. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(2):360–73.
27. VanNoy GE, Genetti CA, McGuire AL, Green RC, Beggs AH, Holm IA. Challenging the Current Recommendations for Carrier Testing in Children. *Pediatrics*. 2019;143(Supplement 1):S27.1-S32.
28. Holm IA, Agrawal PB, Ceyhan-Birsoy O, Christensen KD, Fayer S, Frankel LA, et al. The BabySeq project: Implementing genomic sequencing in newborns. *BMC Pediatr*. 2018;18(1):225.
29. Ceyhan-Birsoy O, Ceyhan-Birsoy O, Murry JB, Machini K, Lebo MS, Rehm HL, et al. Interpretation of Genomic Sequencing Results in Healthy and Ill Newborns: Results from the BabySeq Project. *Am J Hum Genet*. 2019;104(1):76–93.
30. Pereira S, Robinson JO, Gutierrez AM, Petersen DK, Hsu RL, Lee CH, et al. Perceived benefits, risks, and utility of newborn genomic sequencing in the BabySeq project. *Pediatrics*. 2019;143(Supplement 1):S6–13.
31. Genetti CA, Schwartz TS, Robinson JO, VanNoy GE, Petersen D, Pereira S, et al. Parental interest in genomic sequencing of newborns: enrollment experience from the BabySeq Project. *Genet Med*. 2019;21(3):622–30.
32. Ross LF, Clayton EW. Ethical issues in newborn sequencing research: The case study of BabySeq. *Pediatrics*. 2019;144(6):e20191031.
33. Holm IA, McGuire A, Pereira S, Rehm H, Green RC, Beggs AH. Returning a Genomic Result for an Adult-Onset Condition to the Parents of a Newborn: Insights From the



- BabySeq Project. *Pediatrics*. 2019;143(Supplement 1):S37–43.
34. Čalušić B. Mila se uskoro vraća kući: “Oporavak je prošao nevjerojatno dobro, hvala svima!” - *Novi list* [Internet]. 2020 [Pristupljeno 22. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.novolist.hr/novosti/hrvatska/mila-se-uskoro-vraca-kuci-oporavak-je-prosao-nevjerojatno-dobro-hvala-svima/>
  35. Vlada Republike Hrvatske - Potpisan Memorandum o suradnji između Vlade i društva Roche [Internet]. 2019 [Pristupljeno 22. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://vlada.gov.hr/vijesti/potpisan-memorandum-o-suradnji-izmedju-vlade-i-drustva-roche/26396>
  36. Morrissey C, Walker RL. The ethics of general population preventive genomic sequencing: Rights and social justice. Vol. 43, *Journal of Medicine and Philosophy* (United Kingdom). Oxford University Press; 2018. p. 22–43.
  37. Garrett JR, Lantos JD, Biesecker LG, Childerhose JE, Chung WK, Holm IA, et al. Rethinking the “open future” argument against predictive genetic testing of children. *Genet Med*. 2019;21(10):2190–8.
  38. Hart MR, Biesecker BB, Blout CL, Christensen KD, Amendola LM, Bergstrom KL, et al. Secondary findings from clinical genomic sequencing: prevalence, patient perspectives, family history assessment, and health-care costs from a multisite study. *Genet Med*. 2019;21(5):1100–10.
  39. Green RC, Berg JS, Grody WW, Kalia SS, Korf BR, Martin CL, et al. ACMG recommendations for reporting of incidental findings in clinical exome and genome sequencing. *Genet Med*. 2013;15(7):565–74.
  40. Kalia SS, Adelman K, Bale SJ, Chung WK, Eng C, Evans JP, et al. Recommendations for reporting of secondary findings in clinical exome and genome sequencing, 2016 update (ACMG SF v2.0): A policy statement of the American College of Medical Genetics and Genomics. *Genet Med*. 2017;19(2):249–55.
  41. Wilfond BS, Fernandez C V., Green RC. Disclosing Secondary Findings from Pediatric Sequencing to Families: Considering the “Benefit to Families.” *J Law, Med Ethics*. 2015;43(3):552–8.
  42. Martakis K, Brand H, Schröder-Bäck P. Developing child autonomy in pediatric healthcare: towards an ethical model. *Arch Argent Pediatr*. 2018;116(3):e401–8.

43. Ross LF, Saal HM, Anderson RR, David KL. Ethical and policy issues in genetic testing and screening of children. *Pediatrics*. 2013;131(3):620–2.
44. Biswas S, Medne L, Devkota B, Bedoukian E, Berrodin D, Izumi K, et al. A centralized approach for practicing genomic medicine. *Pediatrics*. 2020;145(3):e20190855.
45. Bowdin S, Gilbert A, Bedoukian E, Carew C, Adam MP, Belmont J, et al. Recommendations for the integration of genomics into clinical practice. Vol. 18, *Genetics in Medicine*. 2016. p. 1075–84.
46. Stenson PD, Mort M, Ball E V., Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. Vol. 136, *Human Genetics*. Springer Verlag; 2017. p. 665–77.
47. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: Public archive of interpretations of clinically relevant variants. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D862–8.
48. Costain G, Jobling R, Walker S, Reuter MS, Snell M, Bowdin S, et al. Periodic reanalysis of whole-genome sequencing data enhances the diagnostic advantage over standard clinical genetic testing. *Eur J Hum Genet*. 2018;26(5):740–4.
49. Machini K, Ceyhan-Birsoy O, Azzariti DR, Sharma H, Rossetti P, Mahanta L, et al. Analyzing and Reanalyzing the Genome: Findings from the MedSeq Project. *Am J Hum Genet*. 2019;105(1):177–88.
50. Sorelle JA, Thodeson DM, Arnold S, Gotway G, Park JY. Clinical Utility of Reinterpreting Previously Reported Genomic Epilepsy Test Results for Pediatric Patients. *JAMA Pediatr*. 2019;173(1):1–5.
51. Wright CF, McRae JF, Clayton S, Gallone G, Aitken S, FitzGerald TW, et al. Making new genetic diagnoses with old data: iterative reanalysis and reporting from genome-wide data in 1,133 families with developmental disorders. *Genet Med*. 2018;20(10):1216–23.
52. Khoury MJ. No shortcuts on the long road to evidence-based genomic medicine. Vol. 318, *JAMA - Journal of the American Medical Association*. American Medical Association; 2017. p. 27–8.

53. Murry JB, Machini K, Ceyhan-Birsoy O, Kritzer A, Krier JB, Lebo MS, et al. Reconciling newborn screening and a novel splice variant in BTD associated with partial biotinidase deficiency: a BabySeq Project case report. *Mol Case Stud.* 2018;4(4):a002873.
54. Sabatini LM, Mathews C, Ptak D, Doshi S, Tynan K, Hegde MR, et al. Genomic Sequencing Procedure Microcosting Analysis and Health Economic Cost-Impact Analysis: A Report of the Association for Molecular Pathology. Vol. 18, *Journal of Molecular Diagnostics.* Elsevier B.V.; 2016. p. 319–28.
55. Christensen KD, Phillips KA, Green RC, Dukhovny D. Cost Analyses of Genomic Sequencing: Lessons Learned from the MedSeq Project. *Value Heal.* 2018 Sep;21(9):1054–61.
56. Kris A, Wetterstrand MS. The Cost of Sequencing a Human Genome [Internet]. National Human Genome Research Institute. 2020 [pristupljeno 31. ožujka 2021.]. Dostupno na: <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>
57. Tebani A, Bekri S. High-throughput omics in the precision medicine ecosystem. In: *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers.* Elsevier; 2020. p. 19–31.
58. Arora NS, Davis JK, Kirby C, McGuire AL, Green RC, Blumenthal-Barby JS, et al. Communication challenges for nongeneticist physicians relaying clinical genomic results. *Per Med.* 2017;14(5):423–31.
59. Biesecker LG, Biesecker LB. An approach to pediatric exome and genome sequencing. Vol. 26, *Current Opinion in Pediatrics.* Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 639–45.
60. Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: Towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. Vol. 132, *Human Genetics.* 2013. p. 1077–130.
61. Bélisle-Pipon J-C, Vayena E, Green RC, Cohen IG. Genetic testing, insurance discrimination and medical research: what the United States can learn from peer countries. *Nat Med.* 2019;25(8):1198–204.

62. Lwoff L. Council of Europe adopts protocol on genetic testing for health purposes. *Eur J Hum Genet.* 2009 Nov 1;17(11):1374–7.
63. Joshua C. Denny, M.D., Joni L. Rutter, Ph.D., David B. Goldstein, Ph.D., Anthony Philippakis, M.D., Ph.D., Jordan W. Smoller, M.D., Sc.D., Gwynne Jenkins, Ph.D., M.P.H., and Eric Dishman MS. The “All of Us” Research Program. *N Engl J Med.* 2019;381(7):668–76.
64. Stark Z, Dolman L, Manolio TA, Ozenberger B, Hill SL, Caulfield MJ, et al. Integrating Genomics into Healthcare: A Global Responsibility. Vol. 104, *American Journal of Human Genetics.* Cell Press; 2019. p. 13–20.
65. Gonorazky HD, Naumenko S, Ramani AK, Nelakuditi V, Mashouri P, Wang P, et al. Expanding the Boundaries of RNA Sequencing as a Diagnostic Tool for Rare Mendelian Disease. *Am J Hum Genet.* 2019;104(3):466–83.

# Životopis

## OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Anđela Bevanda

Datum rođenja: 12. 03. 1996.

Mjesto rođenja: Zagreb, Republika Hrvatska

## OBRAZOVANJE

2017. - 2021. Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Republika Hrvatska

2014. - 2017. Sveučilište u Mostaru, Medicinski fakultet, Bosna i Hercegovina

2010. - 2014. Gimnazija fra Dominika Mandića, Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

2010. - 2014. Srednja glazbena škola Široki Brijeg – stečeno zvanje glasovirača, Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

2002. - 2010. Prva Osnovna škola Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

2002. - 2010. Osnovna glazbena škola Široki Brijeg, Široki Brijeg, Bosna i Hercegovina

## NAGRADE I PRIZNANJA

2009.- II nagrada na 12. Federanom te 2. Internacionalnom natjecanju komorne glazbe u kategoriji glasovir četveroručno

2010. - nagrada “Učenik generacije Prve Osnovne škole Široki Brijeg”

2014. - nagrada “Učenik generacije Gimnazije fra Dominika Mandića“

2010. - 2014. - uzastopno osvajanje 1. - 3. mjesto na školskim natjecanjima iz matematike

## AKTIVNOSTI

Lipanj 2020. – aktivno sudjelovanje u 11. Kongresu Društva nastavnika opće/obiteljske medicine: Intervencije i vještine u obiteljskoj medicini s temom „Proceduralne vještine studenata medicine tijekom nastave iz obiteljske medicine“

2019. / 2020. - demonstrator pri katedri pedijatrije Medicinskog fakulteta u Zagrebu

Zima 2019. – pisac za studentski časopis Medicinskog fakulteta u Zagrebu „Medicinar“

Travanj 2019. – sudjelovanje u CROSS15 (Croatian Student Summit)

2018. - 2020. – aktivni član pedijatrijske i kirurške sekcije Medicinskog fakulteta u Zagrebu

2017. - 2020. – aktivni član Pjevačkog zbora studenata Medicinskog fakulteta u Zagrebu „Lege artis“

2016. - 2017. – prvi sopran klape „Bura“

## VJEŠTINE

- Srednja stručna sprema: stečeno zvanje glasovirač
- visoko stručno služenje engleskim jezikom
- DSD (Deutsches Sprachdiplom) razina B2/C1
- aktivno služenje s Microsoft Office-om
- vozačka dozvola B kategorije
- žuti karate pojas

## OSTALO

Hobiji: glazba (glasovir i pjevanje), strani jezici, latinoamerički plesovi, klizanje na ledu