

Значај секвенцирања целог егзома и реверзне фенотипизације у откривању наследне основе глобалног развојног кашњења и интелектуалне ометености у педијатрији

Увод:

Глобално развојно кашњење (ГРК) и интелектуална ометеност (ИО) су неуролошки поремећаји који погађају 1–3% деце глобално, с већом преваленцијом код дечака (однос 1.6:1) [1]. ГРК означава кашњење у развојним милиоказима до пете године, док је ИО трајни дефицит у интелектуалним функцијама и адаптивном понашању деце старије од 5 година [2]. Етиологија ових стања је јако хетерогена, укључујући наследне и ненаследне факторе [3,4]. Варијанте у приближно 2000 гена повезују се са настанком неуроразвојних поремећаја кроз различите биолошке процесе [5]. Осим генетичке основе, фактори попут перинаталних компликација, неповољних срединских утицаја и социоекономског статуса могу значајно утицати на учесталост и тежину поремећаја [6]. Порођајна телесна маса и трајање дојења су идентификовани као важни фактори раног развоја, док приступ здравственој заштити директно утиче на рано препознавање проблема [7].

У клиничкој генетици, код педијатријске популације са ГРК/ИО, дијагностички алгоритам обухвата кариотипизацију, хромозомски микроареј и тестирање на фрагилни X синдром. Ове анализе представљају основне дијагностичке методе за идентификацију специфичних наследних етиолошких дијагноза, укључујући нумеричке и структурне хромозомске аберације и фрагилни X синдром као чест узрок ИО код мушке деце [8]. Геномско тестирање, као што је секвенцирање целог егзома (енг. *Whole Exome Sequencing, WES*), знатно је повећало стопу откривања дијагнозе код деце са ГРК/ИО, са укупном успешношћу од 25% до 50% [9]. *WES* се најчешће користи код пацијената код којих претходне генетичке анализе нису дале позитиван резултат, а клинички знаци или породична анамнеза указују на генетичку основу [10]. Због високих трошкова, индикације за *WES* морају бити пажљиво постављене како би анализа била оправдана и медицински и економски [9,10]. Иако је *WES* значајно побољшао могућност генетичког утврђивања

наследне етиологије неуроразвојних поремећаја, приближно 50% случајева остаје без јасне дијагнозе [11].

Реверзно фенотипизирање (РФ) се показало као важан метод за реевалуацију клиничких симптома и знакова у контексту генетичког налаза добијених путем *WES*. Оваквим приступом доприноси се бољем разумевању порекла клиничких манифестација и повећава укупна успешност дијагностике у овој популацији [12, 13]. Код ретких обољења са недовољно документованим или неконзистентним клиничким обрасцем, РФ је потребно за коначно тумачење генетичког налаза, поготов када се ради о варијантама непознатог значаја (енг. *Variant of Unknown Significance - VUS*), што унапређује дијагностички процес и разумевање развојних поремећаја [14, 15].

Радна хипотеза:

Секвенцирање целог егзома код педијатријских пацијената са ГРК/ИО који имају негативан налаз иницијалног генетског тестирања, омогућава високу стопу детекције патогених варијанти и утврђивање различитих генетских узрока ГРК/ИО. Реверзна фенотипизација (РФ) омогућава додатно појашњење клиничког значаја утврђених варијанти кроз анализу повезаности са социо-демографским, клиничким и фенотипским карактеристикама.

Циљеви истраживања:

1. Утврдити учесталост позитивног налаза секвенцирања целог егзома код педијатријских пацијената са ГРК/ИО са негативним налазом на иницијалном дијагностичком алгоритму генетског тестирања (кариотипизација, хромозомски микроареј и тестирање на фрагилни X).

2. Утврдити дистрибуцију генетичких узрока ГРК/ИО у популацији педијатријских пацијената испитиваних методом секвенцирања целог егзома.

3. Испитати повезаност утврђених генетичких узрока ГРК/ИО са социо-демографским, клиничким, лабораторијским и фенотипским карактеристикама педијатријских пацијената реверзном фенотипизацијом

Материјал и методе:

Тип студије: Истраживање ће бити дизајнирано као студија пресека. Ова методологија омогућава анализу резултата геномског тестирања, епидемиолошких и клиничких параметара прикупљених током дефинисаног временског периода.

Место и период истраживања: Истраживањем ће бити обухваћен временски период од почетка 2017. до краја 2026. године. Истраживање ће бити спроведено у педијатријским установама терцијарне здравствене заштите, Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић” (Београд, Србија), и Клиници за дечје болести, Универзитетски клинички центар Републике Српске (Бања Лука, Република Српска).

За спровођење истраживања прибављена је дозвола од стране Етичког одбора Института за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић“ (протокол број: 8/122), Сагласност стручног колегијума педијатријске клинике Института (протокол број 7061/2) и сагласност Етичког одбора Универзитетског Клиничког Центра Републике Српске (01-5298/24) у складу са принципима Хелсиншке декларације. Прикупљање клиничких података и биолошког материјала биће обављено уз писану сагласност родитеља/старатеља свих педијатријских учесника, са дозволом за употребу у научне сврхе. У случајевима потребе слања биолошког материјала на анализу у иностранство, обезбеђене су званичне дозволе надлежних државних органа Републике Србије (Министарство Здрава Републике Србије- Сагласност за извоз биолошких узорка дел. број 515-07-08741/2021-07 и 515-07-11092/2021-07).

Популација и узорак: Испитивани узорак чиниће укупно 100 педијатријских пацијената узраста од 6 месеци до 18 година са дијагнозом ГРК/ИО. У студију ће бити укључени сви пацијенти прегледани у амбуланти за клиничку генетику два наведена педијатријска терцијарна центра под наведеном дијагнозом (ГРК/ИО) код којих претходним испитивањем другим генетичким методама није утврђена етиологија ГРК/ИО. При селекцији пацијената биће коришћени критеријуми за укључивање у истраживање.

Критеријуми за укључивање у истраживање:

- Присутност знакова развојног поремећаја (односно кашњења у остваривању милиоказа развоја у моторним, језичким, социјалним или когнитивним доменама) за пацијенте млађе од пет година, односно клиничка дијагноза интелектуалне ометености код пацијената старијих од 5 година.
- Нормалан налаз претходно предузетих генетичких тестова (MLPA на микроделеционе и микродупликационе синдроме, анализа на фрагилни X синдром, хромозомски микроареј).
- Доступност медицинске документације о клиничкој евалуацији.

Критеријуми за искључивање:

Пацијенти који не испуњују ове критеријуме, као и они код којих медицинска документација није доступна или потпуна, неће бити предмет истраживања.

Инструменти и поступци мерења:

Сви пацијенти ће проћи кроз детаљну клиничку, епидемиолошку и генетичку евалуацију.

Тестови који претходе секвенцирању целог егзома:

- Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) на микроделеционе/микродупликационе синдроме.
- Хромозомска микроареј анализа: Користи се за детекцију хромозомских аберација на субмикроскопском нивоу.

- Молекуларна анализа за фрагилни X синдром: AmplideX PCR/CE FMR1 кит се користи за откривање мутација у FMR1 гену, одговорном за најчешћи наследни узрок ИО код дечака.
- Секвенцирање целог егзома (енг. *Whole Exome Sequencing, WES*)

Лабоарторије:

1. Институт за молекуларну генетику и генетичко инжењерство, Универзитет у Београду, Србија: Тестирање помоћу NextSeq 2000 Illumina секвенцера употребом Exome 2.0 Plus панела, упоређивањем са референтним хуманим геномом hg38 и претрагом gnomAD Exomes и gnomAD Genomes популационих база података ради интерпретације пронађених генетичких варијанти.
2. Универзитетски медицински центар Љубљана, Словенија: Тестирање је спроведено помоћу Illumina Nextera Rapid Capture Exome или Twist Core Exome платформи.

WES омогућава анализу егзомских секвенци свих гена код пацијената, циљајући око 30–40 милиона базних парова генома, и омогућава откривање варијанти повезаних са различитим развојним поремећајима, укључујући ГРК/ИО. Код групе пацијената код којих су откривене варијанте непознатог значаја, спроводи се валидација резултата Сангеровом методом и сегрегациона анализа узорака родитеља, како би се потврдила наследност откривене варијанте.

Реверзна фенотипизација (РФ) представља поступак ретроспективне клиничке процене фенотипа пацијента након добијања резултата генетичког тестирања, са циљем да се утврди постојање клиничких знакова који подржавају дијагнозу засновану на идентификованој генетској варијанти. Овај поступак укључује:

1. Реевалуацију клиничких и демографских података (укупно 14 параметара- узраст, пол, перинаталне компликације, ГРК/ИО, елементе дизморфије, поремећај вида,

слуха, присуство епилепсије, срчане, бубрежне, ендокринолошке, метаболичке, јетрене и скелетне поремећаје) о пацијенту у контексту налаза *WES*-а.

2. Додатне медицинске и лабораторијске тестове како би се утврдило постојање клиничких карактеристика које одговарају добијеном генетичком налазу.

3. Генотипско-фенотипска корелација ради повезивања специфичних карактеристика обољења са добијеним генетским факторима ризика.

РФ ће бити примењено као метод у случајевима када резултати *WES*-а указују на промене у генима који нису претходно повезивани са ГРК/ИО или су варијанте биле класификоване као варијанте непознатог значаја (*VUS*).

Статистичка анализа:

Сви прикупљени подаци биће статистички обрађени уз помоћ софтвера IBM SPSS Statistics, верзија 20.0.1.

1.Дескриптивна статистика:

Континуиране променљиве са нормалном расподелом биће представљене као средња вредност $\pm$ стандардна девијација, док ће променљиве без нормалне расподеле бити приказане као медијана и интерквartilни опсег.

Категоријалне променљиве ће бити приказане као апсолутне и релативне учесталости. Нормалност расподеле континуираних података процењиваће се применом Колмогоров-Смирновљевог и Шапиро-Вилковог теста.

2.Аналитичка статистика

За испитивање статистички значајне повезаности између категоријалних променљивих користиће се хи-квадрат тест.

За поређење континуираних променљивих између група користиће се студентов Т-тест (за

податке са нормалном расподелом) или Mann-Whitney U тест (за податке који не прате нормалну расподелу).

Логистичка регресиона анализа биће примењена ради испитивања утицаја независних променљивих – као што су узраст, пол, присуство епилепсије, метаболичке абнормалности– на вероватноћу добијања позитивног налаза *WES* (секвенцирање целог егзома).

3.Процена величине узорка:

Процена потребне величине узорка извршена је у програму G*Power 3.1, за логистичку регресију уз очекивани odds ratio од 2.5, $\alpha = 0.05$, статистичку снагу од 80% и претпостављену базну стопу позитивних налаза од 40%. При малој до умереној интеркорелацији клиничких предиктора ($R^2 = 0.10$), утврђено је да је за поуздану анализу потребно минимум 88 испитаника. У студију ће бити укључено 100 педијатријских пацијената са ГРК/ИО, што одговара статистичким критеријумима. С обзиром на то да је реч о ретком генетичком обољењу, узорак је формиран мултицентрично и ретроспективно, што је омогућило прикупљање адекватног броја испитаника у дужем временском периоду.

Процена кандидата о потенцијалном научном доприносу:

Ова дисертација може значајно допринети унапређењу приступа (алгоритма) у генетичкој дијагностици код деце са глобалном развојном ометеношћу и интелектуалном ометеношћу. Прецизно сагледавање дијагностичког доприноса (стопе успешности) секвенцирања нове генерације методом *WES* за индикацију ГРК/ИО допринеће бољем дефинисању индикационог подручја за овај метод у једној од кључних области педијатрије.

Потенцијални допринос огледа се и у дефинисању начина интеграције геномских података (типа и патогености генетских фактора ризика) са клиничким налазима, како пре теста тако и после теста, са посебним нагласком на постгенетичку евалуацију методом

реверзног фенотипизирања. Значајан допринос биће и опис спектра генетичких узрока ГРК/ИО у педијатријској популацији у нашој средини, што ће омогућити поређење генетичко-епидемиолошких података са резултатима из других популација различитог етничког и географског порекла.

Референце:

1. Srour M, Shevell M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch Dis Child* 2014;99:386–9.
2. American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 5th ed.; The American Psychiatric Association: Arlington, TX, USA, 2013.
3. Maia N, Nabais Sá MJ, Melo-Pires M, de Brouwer APM, Jorge P. Intellectual disability genomics: Current state, pitfalls and future challenges. *BMC Genomics* 2021;22:1–17.
4. Marrus N, Hall L. Intellectual Disability and Language Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2017;26:539–54.
5. Chiurazzi P, Pirozzi F. Advances in understanding—Genetic basis of intellectual disability. *F1000Research* 2016;5:599.
6. Khan I, Leventhal BL. *Developmental Delay*. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, 2022.
7. Srivastava S, Love-Nichols J, Dies K, Ledbetter D, Martin C, Chung W, Hansen R. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: Exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. *Genet Med* 2019;21:2413–21.

8. Stefanski A, Calle-López Y, Leu C, Pérez-Palma E, Pestana-Knight E, Lal D. Clinical sequencing yield in epilepsy, autism spectrum disorder, and intellectual disability: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsia* 2021;62:143–51.

9. Shashi V, McConkie-Rosell A, Rosell B, Schoch K, Vellore K, McDonald M, Goldstein DB. The utility of the traditional medical genetics diagnostic evaluation in the context of next-generation sequencing for undiagnosed genetic disorders. *Genet Med* 2014;16:176–82.

10. Jo YH, Choi SH, Yoo HW, Kwak MJ, et al. Clinical use of whole exome sequencing in children with developmental delay/intellectual disability. *Pediatr Neonatol.* 2024 Sep;65(5):445-450. doi: 10.1016/j.pedneo.2023.05.015. Epub 2024 Jan 23. PMID: 38281861

11. Manickam K, McClain MR, Demmer LA, et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability: An evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2021;23:2029–37.

12. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, 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;17:405–24.

13. Leite AJDC, Pinto IP, Leijsten N, et al. Diagnostic yield of patients with undiagnosed intellectual disability, global developmental delay and multiples congenital anomalies using karyotype, microarray analysis, whole exome sequencing from Central Brazil. *PLoS ONE* 2022;17.

14. Dingemans AJM, Hinne M, Jansen S, et al. Phenotype based prediction of exome sequencing outcome using machine learning for neurodevelopmental disorders. *Genet Med* 2022;24:645–53.

15. Wenger AM, Guturu H, Bernstein JA, Bejerano G. Systematic reanalysis of clinical exome data yields additional diagnoses: Implications for providers. *Genet Med* 2017;19:209–14.