

## ZAKLJUČNO POROČILO

*o rezultatih internega raziskovalnega projekta UKC Maribor  
za obdobje od 14. 10. 2021 do 13. 10. 2023*

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta:	IRP-2021/01-03	
Naslov projekta:	ZGODNJE ODKRIVANJE GENETSKIH DEJAVNIKOV TVEGANJA ZA NENADNO SRČNO SMRT PRI NAVIDEZNO ZDRAVIH MLADIH ŠPORTNIKI	
Vodja projekta:	doc. dr. Špela STANGLER HERODEŽ, univ. dipl. inž. kem. tehnol.	
Trajanje projekta (leta, od-do):	2 leti	14. 10. 2021 - 13. 10. 2023
Velikost projekta	<input type="checkbox"/> mali (do 10.000,00 EUR)	<input type="checkbox"/> veliki (do 50.000,00 EUR)

### B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

#### 1. Poročilo o realizaciji predloženega programa raziskovalnega projekta - opis raziskave (izhodišča, predstavitev problema, metode dela), ugotovljeni rezultati in uporaba (največ do 3 strani)

Genomske analize na področju športne kardiologije so velika pridobitev za diagnostiko in klinično obravnavo športnikov napotenih iz IŠM na dodatne preglede in preiskave Oddelek za kardiologijo in angiologijo v UKC Maribor, ki je pomemben center z elektrofiziološko dejavnostjo srca. Genetska analiza je najpomembnejša diagnostična metoda pri končni odločitvi o terapiji in jasen prognostični napovedni dejavnik mladega športnika in njegovih potomcev. Športniku, ki ga zaščitimo pred zastojem srca zaradi ventrikularne fibrilacije (VF) smo rešili življenje oziroma njegov zastoj srca, ki vodi ob morebitnem preživetju v nepopravljivo nevrološko okvaro in trajno invaliditeto.

Do sedaj uporabljene tehnike molekularne genetske diagnostike so omogočale analizo posamičnih genov, ki pa se v LMG niso izvajale, ker so bile metode prezamudne in predrage. Naslednja generacija sekvenciranja (NGS) omogoča hiter in celovit pristop, ki ima tako diagnostičen kot prognostičen pomen v športni kardiologiji. Metoda omogoča analizo 174 genov simultano v enem poskusu, kar je ne glede na začetni visok strošek, veliko ceneje in hitreje kot klasično sekvenciranje posamičnih genov po Sangerju. Hitrost analize možnih kandidatnih genov je ključna za hitro in natančno klinično intervencijo, ki omogoča pri obravnavi športnega srca pravilno razlikovanje med fiziološkimi prilagoditvami in srčno-žilnimi boleznimi. S tem se izognemo nepotrebnim diskvalifikacijam športnikov zaradi napačne postavitve diagnoze srčno-žilne bolezni, obenem pa ne zamenjamo začetnih patoloških sprememb za fiziološke, kar bi bilo za športnika lahko usodno z

nadaljevanjem tekmovalnega športa.

V okviru dve leti trajajočega raziskovalnega projekta je bilo z metodo NGS uspešno sekvenciranih 41 vzorcev DNA, pridobljenih iz periferne venske krvi navidezno zdravih mladih športnikov. V ta namen je bil uporabljen tarčni panel TruSight Cardio (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA), ki zajema 174 genov, vključenih v več srčnih motenj.

S sekvenciranjem smo dosegli 300 - kratno povprečno globino sekvenciranja tarčnih regij in 99,3% pokritosti izbranih eksonov s >10-kratno pokritostjo. Doseženi parametri so nam za izbrane regije zagotavljajo več kot 90% občutljivost zaznavanja heterozigotne in 99% občutljivost za odkrivanje homozigotnih variant.

Za pripravo knjižnice tarčnega sekvenciranja z analizo NGS po TruSight Cardio Sequencing Kit protokolu (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) smo uporabili 100 ng DNA izolirane iz periferne venske krvi. Sekvenciranje vzorca je potekalo po protokolu obojestranskega sekvenciranja v 2x150 ciklih na Illumina MiSeq sekvenatorju. Analiza dobljenih podatkov je bila izvedena z MiSeq Reporter programom 2.5.42.5 v skladu s postopkom BWA Enrichment, kjer se v prvem koraku izvede ločitev branih odsekov sekvenc po vzorcih na podlagi dodeljenih identifikacijskih zaporedij. V drugem koraku se ustvarijo datoteke FASTQ. Brani odseki sekvenc se nato poravnajo s celotnim referenčnim genomom Homo sapiens (UCSC hg19) z uporabo Burrows-Wheeler Aligner (BWA 0.7.7-isis-1.0.2). Z uporabo GATK v1.6-23-gf0210b3 programa se odstopanja v sekvenci branih sekvenc zapišejo v obliki VCF datotek. Za analizo VCF datotek se uporabljajo Variant Studio program (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) in prostodostopna bioinformatična orodja in podatkovne baze za interpretacijo podatkov dobljenih z analizo NGS v skladu z American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) smernicami (Richards et al., 2015).

Analiza NGS nam omogoča detekcijo različic v kodirajočih eksonskih tarčnih regijah in eksonsko-intronskih mejah (+/-10 baznih parov) s vsaj 5-kratno pokritostjo ter prisotnostjo različice v 20% branih odsekov. Različice ne moremo določiti kadar je pokritost tarčne regije manjša od 5-kratne pokritosti. Prav tako z analizo ne moremo izključiti delecij ali duplikacij eksonov ter trinukleotidnih ekspanzij.

Pri 4 športnikih smo našli patogene/verjetno patogene različice v genih *LDLR*, *DTNA*, *CREB3L3* in *TTN*. Različice neznanega pomena (VOUS) v genih *MYLK*, *MYH11*, *SCN2B*, *MYPN*, *HCN4*, *ANK2*, *KCNQ1*, *JPH2* so bile identificirane pri 8 športnikih. Za vse je bilo svetovano podrobnejše spremljanje pri kardiologu.

Zaključimo lahko, da je NGS analiza ključ do hitre in natančne klinične intervencije, ki omogoča pravilno razlikovanje med športnim srcem in kardiomiopatijo. Na ta način ne zamenjamo začetnih patoloških sprememb s fiziološkimi, ki bi lahko bile ob nadaljevanju tekmovalnega športa za športnika usodne.

2. Ocena stopnje realizacije in zastavljenih raziskovalnih ciljev (*obkrožite*)

DA

NE

Če je odgovor NE, napišite kratko utemeljitev

**3. Pridobitev za UKC Maribor - doktorska disertacija, članek, prispevek na znanstveni konferenci/simpoziju ali kongresu, patent, uvedba novih dejavnosti, smernic in metod ali izboljšanje že obstoječih itd. (največ do 1 stran)**

Doktorska disertacija, magistrska naloga, raziskovalna naloga, specialistična naloga: /
Objavljeni članki: /
Nove metode, smernice, dejavnosti: Uvedba metode naslednje generacije sekvenciranja (NGS) za hiter in celovit pristop, z diagnostičnim in prognostičnim pomenom, v športni kardiologiji.
Prispevki (konference, srečanja, kongresi, simpoziji): /

**4. Sumaričen prikaz ciljev projekta (obvezno izpolnite!)**

	Doktorat, magisterij, raziskovalna ali specialistična naloga	Objavljeni članki	Nove metode, smernice, dejavnosti	Prenos znanja (konference, srečanja, kongresi, simpoziji)
(DA/NE)	NE	NE	DA	NE
Število	0	0	1	0

Datum: 10.11.2023	Podpis vodje projekta: doc. dr. <del>Spela STANGLER HERODEŽ</del> univ. dipl. inž. kem. teh
-------------------	---

Izpolni Oddelek za znanstveno-raziskovalno delo	
<b>REALIZACIJA PROJEKTA</b> <input type="checkbox"/> CILJI IZPOLNJENI V CELOTI <input type="checkbox"/> CILJI DELNO IZPOLNJENI <input type="checkbox"/> CILJI NISO IZPOLNJENI <b>Porabljena sredstva (v EUR):</b> _____	<b>Pregledal in ocenil predstojnik OZRD:</b>  <b>Podpis:</b> _____  <b>Datum:</b> _____