



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-
СОФИЯ,
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ

Д-р Траян Недялков Делчев

Генетична и клинична характеристика на пациенти с краниосиностоза

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”

Шифър 7.1.

Професионално направление: „Медицина”

Научна специалност: „Педиатрия”

Научен ръководител:

Доц. д-р Даниела Авджиева-Тзавелла д.м.

София, 2022 г.



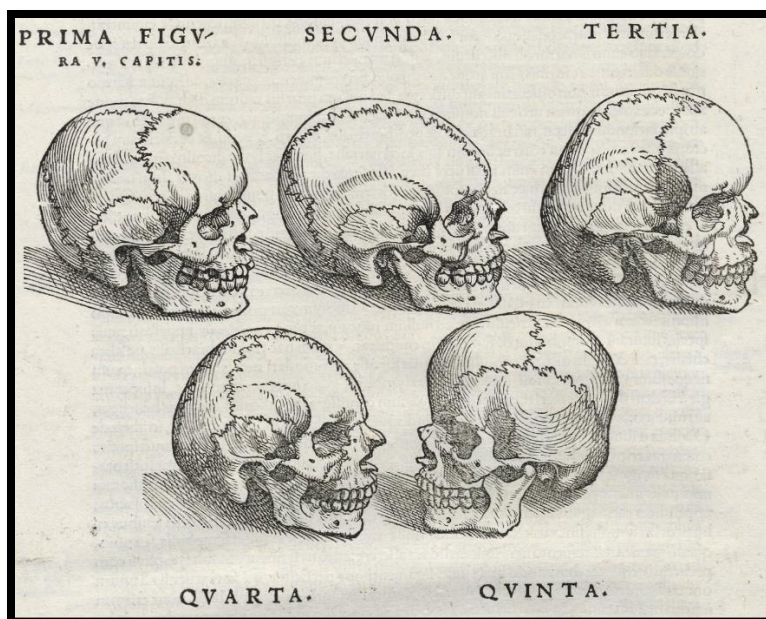
Приятно ми е да изкажа своята дълбока благодарност към хората, които помогнаха за осъществяването на настоящият дисертационен труд.

Най-искрено благодаря на:

- научният ми ръководител доц. д-р. Даниела Авджиева-Тзавелла, д.м за подкрепата и доверието, които ми оказва през годините на съвместната ни работа; за ценните съвети в клиничните и научни аспекти на генетиката; за

търпението и разбирането в най-трудните моменти от подготовката на настоящия дисертационен труд;

- проф. Савина Хаджидекова (ръководител на катедра Медицинска генетика), за проявените търпение, внимание и добро отношение при обсъждането на генетичните находки, както и за провеждането на сравнителна геномна хибридизация при пациентите с краниосиностоза;
- на екипа на Отделението по клинична генетика за подкрепата, която ми оказват в дългогодишната ни съвместна работа и помощта в грижите за нашите пациенти;
- на всички колеги от клиниките на СБАЛДБ Проф. Иван Митев – за професионалното отношение и ефективна колаборация при диагностичните и терапевтични усилия в грижите за общите ни пациенти;
- На д-р Илияна Бонева за осъществяването на конвенционалното цитогенетично изследване при нашите пациенти;
- На д-р Динко Захариев за анализа и многократните ревизии на краниографиите на децата със синостоза на черепните шевове;
- На д-р Адил Кадъм, д.м – за вдъхновението и хумора, с които ни зареждаше; за неизменното приятелско отношение и подкрепа, както и за примерната жертвоготовност в името на пациентите. Светла ѝ памет!
- на всички пациенти и техните родители за съдействието при реализирането на този научен труд;
- на семейството ми за това, че ми дава така необходимите: любов, подкрепа и разбиране!



СЪДЪРЖАНИЕ

A.	Списък на таблиците	7
B.	Списък на фигурите	7
C.	Списък на приложенията	10
D.	Списък на съкращенията:	11
1.	Съкращения на кирилица:	11
2.	Съкращения на латиница:	12
I.	Увод	14
II.	Литературен обзор	15
1.	Определение и специфична терминология	15
2.	Исторически и културен контекст	16
3.	Ембриогенеза и анатомия на черепа и черепно-мозъчните шевове	23
4.	Специфични лиганди и рецептори, регулиращи състоянието на черепно-мозъчните шевове	29
5.	Класификация	34
6.	Честота	38
7.	Етиология	39
7.1	Хромозомни аберации	39
7.2	Микроструктурни (субмикроскопски) хромозомни аберации	42
7.3	Моногенни (синдромни) краниосиностози	43

7.4	Други синдроми асоциирани с краниосиностоza	59
7.5	Метаболитни болести и краниосиностоza	64
8.	Генетични тестове прилагани в съвременната диагностика на деца с краниосиностоza	70
8.1	Конвенционално кариотипиране	70
8.2	Мултиплексна лиганд зависима сондова амплификация (MLPA)	71
8.3	Сравнителна геномна хибридизация (Array-based comparative genomic hybridization – aCGH)	72
8.4	Секвениране по Sanger (таргетно секвениране)	83
8.5	NGS – секвениране от ново поколение	84
8.6	Цялостно екзомно секвениране (WES), цялостно геномно секвениране (WGS)	85
9.	Диагностичен подход при деца с краниосиностоza	86
10.	Терапевтичен подход при деца с краниосиностоza	88
III.	Цел и задачи	90
1.	Цел	91
2.	Задачи	91
IV.	Методи и материали	92
1.	Участници в проучването	92
2.	Клинична оценка на пациентите	94
3.	Биологични проби	96
4.	Методи за генетичен скрининг	96
4.1	Конвенционален цитогенетичен метод	97
4.2	Микроделеционен анализ – MLPA	100
4.2.1	Определение:	100
4.2.2	Методология	100
4.3	Сравнителна геномна хибридизация (микрочипов анализ) – олигонуклеотидни микрочипове	101
4.3.1	Апаратура	102
4.3.2	Реактиви и консумативи	102
4.3.3	Техника	103
4.3.4	Подготовка на пробата	103
4.3.5	Белязане	103
4.3.6	Пречистване и комбиниране на белязаните проби	104
4.3.7	Хибридизация	105

4.3.8 Промиване	106
4.3.9 Скениране на микрочиповете.....	107
4.3.10 Софтуерен анализ на данните	107
4.4 Новогенерационно секвениране – NGS.....	109
V. Резултати и обсъждане	110
1. Клинична оценка	110
2. Показатели на калциево-фосфорната обмяна	127
3. Генетичен скрининг	129
3.1 Конвенционално кариотипиране.....	129
3.2 MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации	136
3.3 Сравнителна геномна хибридизация (arrayCGH).....	144
3.4 Таргетно секвениране по Sanger и NGS панели за краниосиностоза....	148
4. Метаболитни находки при децата с краниосиностоза	156
VI. Изводи.....	160
VII. Приноси	162
1. Приноси с научен характер – оригинални:.....	162
2. Приноси с научен характер – потвърдителни:.....	162
3. Приноси с приложен характер:	163
VIII. Приложения	163
1. Приложение 1	163
2. Приложение 2	164
3. Приложение 3	166
4. Приложение 4	168
IX. Литературни източници	169
X. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ	191

А. Списък на таблиците

Таблица 1: Молекулни активатори и инхибитори на сутурална осификация.....	30
Таблица 2: Моногенни краниосиностози – общи характеристики.....	44
Таблица 3: Съвременни методи да цялостно геномно CNV-скриниране.....	77
Таблица 4: Допълнителни находки в групата на деца със синдромна краниосиностоза.....	123
Таблица 5: Пациенти с доказана краниосиностоза и анамнеза за предхождащи аборти, мъртвородени деца в семейството, и съответната генетична находка.....	126
Таблица 6: Находки от конвенционална цитогенетика при изследваната група деца с краниосиностоза.....	131
Таблица 7: Съпоставка на находките от конвенционалната цитогенетика и тези от MLPA.....	138
Таблица 8: Обобщение на находките от aCGH, съпоставени с находките от конвенционалното кариотипиране и с тези от MLPA.....	147
Таблица 9: Обобщение на засегнатите хромозомни региони (от aCGH) и съдържащите се в тях генни секвенции.....	148
Таблица 10: Обобщение на метаболитните находки при изследваните деца с краниосиностоза	157

В. Списък на фигурите

Фигура 1: Краниум 14 (механична реконструкция) – видима е характерната за задната плагицефалия, трапецовидна деформация на черепа.....	18
---	----

Фигура 2: Анатомична репрезентация на Бенямина (Краниум 14) – наблюдава се значителна лицева асиметрия и деформация на черепа.....	19
Фигура 3: Деформирани неандерталски черепи с долихо- и турицефалия. Археологически находки от 40 000 пр.н.е. в територията на днешен Ирак.....	20
Фигура 4: Фараон Акенатон, Нефертити и трите им дъщери с демонстративна скафоцефалия в резултат на екзогенна сагитална краниосиностоза (Neues Museum, Berlin).....	21
Фигура 5: Методи и приспособления за краниална деформация от Северна Америка (вляво) и Индонезия (вдясно), датирани от I до V-ти век.....	22
Фигура 6: Приспособления за форсирана черепна деформация от VII до XVII-ти век.....	23
Фигура 7: Сравнителна анатомична схема на черепа на новородено (А и В) и на възрастен човек (С, D).....	25
Фигура 8: Основните сутури на калварията – А и напречен срез, представящ анатомичните части на черепно-мозъчните шевове – В.....	26
Фигура 9: Анатомия на калварията, сутурите и фонтанелите.....	28
Фигура 10: Краниален индекс = бипариетален диаметър БПД (А) x 100, разделен на окципитофронталния диаметър - ОФД (В).....	29
Фигура 11: Структура и функция на фибробластните растежни фактори (FGF) и техните рецептори (FGFR).....	33
Фигура 12: Връзки и взаимодействия между различните лиганди и рецептори, участващи в регулацията на краниалните шевове.....	34
Фигура 13: Нормоцефалия и основните патоанатомични варианти на черепа при краниосиностоза.....	38
Фигура 14: Схема на човешки кариотип, на която са обозначените хромозомните делеции и дупликации, асоциирани с краниосиностоза.....	41
Фигура 15: Характерен лицево-черепен дисморфизъм при синдрома на Apert.....	48
Фигура 16: Типичен лицев и черепен дисморфизъм при синдром на Pfeiffer.....	49
Фигура 17: Краниофациален дисморфизъм и кореспондиращи находки от КАТ с 3D реконструкция при синдрома на Crouzon.....	50
Фигура 18: Типичен кранио-фациален дисморфизъм при синдром на Muenke.....	52

Фигура 19: Типичен кранио-фациален дисморфизъм и КАТ находка при Краниофронтоназална дисплазия.....	53
Фигура 20: Типичен кранио-фациален дисморфизъм и рентгенови находки при синдрома на Jackson-Weiss.....	54
Фигура 21: Типичен дисморфизъм и кожно засягане при синдрома на Beare-Stevenson cutis gyrate.....	55
Фигура 22: Дисморфизъм и костни промени при „Bent bone“ дисплазия.....	56
Фигура 23: Характерен краниофациален дисморфизъм при синдрома на Saethre-Chotzen.....	57
Фигура 24: Характерен краниофациален дисморфизъм и кореспондиращите КАТ находки при синдрома на Carpenter.....	58
Фигура 25: Новородено дете със синдром на Antley-Bixler - характерен краниофациален дисморфизъм (А) и (В), рентгенови находки („огънати дълги кости“) (С) и компютърно-томографска реконструкция на черепа (D).....	59
Фигура 26: Характерен дисморфизъм при синдрома на Sotos.....	61
Фигура 27: Характерен дисморфизъм при синдрома на Nijmegen Breakage.....	62
Фигура 28: Лицев дисморфизъм при различните синдроми в рамките на RAS-опатиите.....	64
Фигура 29: Характерен дисморфизъм при синдрома на Kabuki make-up.....	65
Фигура 30: Пациенти с мукополизахаридоза тип VI (Maroteaux-Lamy) – характерен лицев дисморфизъм и скелетни промени.....	67
Фигура 31: Типичен фенотип (А), дентални промени (В) и деформация на гръдния кош (С) при дете с Хипофосфатазия. В ляво – характерна находка от рентгенографии на крайниците.....	68
Фигура 32: Ахондроплазия – характерен фенотип при новородено дете (А), при същото дете на 3 годишна възраст и типични рентгенографски находки на долни крайници - (С).....	70
Фигура 33: Схематично представяне на аграу CGH.....	74
Фигура 34: Разпределение на изследваните деца по пол.....	94
Фигура 35: Разпределение на изследваните деца по възраст.....	95
Фигура 36: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 90 – изолирана метопична краниосиностоз.....	113
Фигура 37: Разпределение на децата в нашата група според засегнатия шев.....	114
Фигура 38: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 35.....	129

Фигура 39: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 92 - 15q микродупликационен синдром.....	138
Фигура 40: Дисморфични стигми при пациент номер 57 – синдром на Sotos.....	143
Фигура 41: Дисморфични стигми при пациент номер 93 – синдром на Koolen-de Vries.....	145
Фигура 42: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 22 (синдром на Muenke): А – предоперативен дисморфизъм на 6 месечна възраст; В – резултати след краниопластика и адвансмънт на 9 месечна възраст; С и D остатъчен дисморфизъм при детето на 3 годишна възраст.....	151
Фигура 43: Лицево-черепен дисморфизъм при пациент номер 96 - Autosomal dominant structural brain anomalies with impaired intellectual development and craniosynostosis.....	153
Фигура 44: Лицево-черепен дисморфизъм при пациент номер 97 – Краниофронтоназална дисплазия.....	154
Фигура 45: Дисморфични стигми при пациент номер 98 – синдром на Saethre- Chotzen.....	155
Фигура 46: Дисморфични стигми при пациент номер 99 – синдром на Pfeiffer тип	156
Фигура 47: Дисморфични стигми при пациент номер 32 – неуточнена хиперамониемия, краниосиностоза и косангвининтет в семейството.....	160

С. Списък на приложенията

Приложение 1: Обща таблица, съдържащата основната информация за всички пациенти, включени в настоящия дисертационен труд.....(моля вижте приложения Excel-файл)	
Приложение 2: Информирано съгласие за пациента	165
Приложение 3: Информирано съгласие за родителите на пациента.....	166
Приложение 4: Диагностичен алгоритъм при български деца с краиниосиностоза	169

D. Списък на съкращенията:

1. Съкращения на кирилица:

- АД – автозомно-доминантно (унаследяване)
- АР – автозомно-рецесивно (унаследяване)
- БА – белодробна артерия
- БПД – бипариетален диаметър
- ВСМ – вродени сърдечни малформации
- ГаГ – глюкозо-амино-гликани (мукополизахариди)
- Гб – гигабази (базови двойки)
- ГЕРБ – гастро-езофагеална рефлуксна болест
- ГИТ – гастро-интестинален тракт
- ГДП – горни дихателни пътища
- ДМСГД – дом за медико социални грижи за деца
- ДЦП – детска церебрална парализа
- ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина
- ДУЦ – дефекти на урейния цикъл
- ЕЕГ – електроенцефалограма
- ЕЦМ - екстрацелуларен матрикс
- ИС – имунна система
- КАТ (КТ) – компютърна аксиална томография
- Кб – килобази (базови двойки)
- Л-Д шънт – ляво-десен шънт
- МКД – междукамерен дефект
- МПЗ – мукополизахаридоза
- НПР – нервно-психично развитие
- ОДА – опорно-двигателен апарат
- ОС – отделителна система
- ОФД – окципитофронтален диаметър
- пр.н.е. – преди новата ера

- РНК – рибонуклеинова киселина
- СН – сърдечна недостатъчност
- ССС – сърдечно-съдова система
- УНГ – уши-нос-гърло
- ФХА - фитохемаглутинин
- ЦНС – централна нервна система
- ЯМР - Ядрено-Магнитен Резонанс

2. Съкращения на латиница:

- aCGH (array CGH, oligo-arrayCGH) – array-based comparative genomic hybridization – арейна (микрочипова) сравнителна геномна хибридизация
- ADBAIDCS - Autosomal Dominant structural Brain Anomalies with Impaired intellectual Development and Craniosynostosis – Автозомно Доминантни вродени Мозъчни Аномалии, Интелектуален Дефицит и Краниосиностоза
- ADHD – attention deficiency hyperactivity disorder – синдром на хиперактивност и дефицит на вниманието
- ASD – autism spectrum disorder – разстройство от аутистичния спектър
- BAC - Bacterial Artificial Chromosomes – бактериални артифициални хромозоми
- BMPs – bone morphogenetic proteins – костни морфогенни протеини
- CFC – Cardiofaciocutaneous syndrome – кардиофациокутанен синдром
- CFND – craniofrontonasal dysplasia – краниофронтоназална дисплазия
- CNV - copy number variations – вариации в броя копия
- CPAP – continuous positive airway pressure – продължително позитивно налягане в дихателните пътища
- DECIPHER - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources – специфична база данни за хромозомни аберации и съответния им фенотип
- Del – deletion - делеция
- DLR raw - Derivative log Ratio raw – производно отношение, първично
- DLR fused - Derivative log Ratio fused - производно отношение, след фузия
- Dup – duplication - дупликация

- EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid – ЕДТА - Етилендиаминтетраоцетна киселина
- FO – foramen ovale
- FISH – fluorescent in situ hybridization – флуоресцентна in situ хибридизация
- *FGFR (1-4)* – Fibroblast Growth Factor Receptor (gene) – рецептор за фибробластния растежен фактор
- GTG – G-banding by Trypsin and Giemsa – конвенционално G-бандиране чрез Трипсин и оцветяване по Гимза
- HGNC – hugo gene nomenclature committee – комитет по hugo-генна номенклатура
- IGF – insulin-like growth factor – инсулино-подобен растежен фактор
- IQ – intelligence quotient – коефициент на интелигентност
- Kb – Kilo bases – килобази (базови двойки)
- Mb – Mega bases – мегабази (базови двойки)
- LCRs – low copy (number) repeats – слабо копирани повтори
- MLPA – multiplex ligation-dependent probe amplification – мултиплексна лиганд-зависима сондова амплификация
- *MSX2* – Msh Homebox 2
- NBS - Nijmegen Breakage Syndrome
- NGS – new generation sequencing – секвениране от ново поколение
- OGT – oxford gene technology – генна технология - Оксфорд
- PMT - photomultiplier tube – фотомултиплицираща тръба
- PCR – polymerase chain reaction – полимеразна верижна реакция
- QC - Quality control – контрол на качеството
- RefSeq – reference sequence database – база данни за референтни секвенции
- Rob – robertsonian (translocation) – робертсонова (транслокация)
- SNP – single nucleotide polymorphisms – мононуклеотидни полиморфизми
- *SHOX* - short-stature homebox
- WES – whole exome sequencing – цялостно екзомно секвениране
- WGS – whole genome sequencing – цялостно геномно секвениране

I. Увод

Краниосиностозата е процес на преждевременна осификация и облитерация на един или повече от черепно-мозъчните шевове [Cohen *et al.* 2000]. Това води до ограничен обем на черепа с невъзможност за анатомична акомодация на нарастващите вътречерепни тъкани и органи. В резултат се оформя краниална деформация, лицев дисморфизъм и повишен вътречерепен натиск. Основните усложнения на краниосиностозата са: неврологични, психични, поведенчески, зрителни и слухови увреждания.

Общата честота на краниосиностозата в световен мащаб е около 1 на 2500 новородени деца [Cohen *et al.* 2000], като тя може да се дължи на екзогенни (позиционни, травматични) или на ендемогенни фактори (ендокринни, генетични). Поделена се на синдромна (когато черепната деформация е част от малформативен синдром) и несиндромна (изолирана), когато краниосиностозата е единствена проява. Несиндромната краниосиностоза съставлява около 80 % от всички случаи [Jehee *et al.* 2008]. Съвременните проучвания показват, че в основата на този вид синостоза често стоят генетични причини. Синдромната синостоза се установява при 20 % от случаите, като в една трета от тях се дължи на патогенни варианти в определен ген – т.нар. моногенни краниосиностози [Sarovic *et al.* 2015]. Те се дължат на мутации в следните гени: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1*, *MSX2*, *RAB23*, *RUNX2* и се предават по автозомно-доминантен механизъм (с изключение на *RAB23*). Хромозомни аберации стоят в основата на 14-16 % от случаите със синдрома краниосиностоза [Jehee *et al.* 2008; Sarovic *et al.* 2015].

Въпреки значителния научен напредък в последните години, голяма част от генетичните и клинични особености на краниосиностозата остават неясни. Този факт, придружен от значителната кумулативна честота и риска от тежки усложнения, ни мотивираха да проведем мащабно изследване на български деца с краниосиностоза. В проучването бяха включени 99 деца, хоспитализирани в отделението по Клинична генетика на СБАЛДБ „Проф. Иван Митев“ – София, за периода 2017-2021 година. Освен щателна клинична оценка, при децата се проведе и системен комбиниран генетичен скрининг. За целта се приложиха следните методи: конвенционално кариотипиране, микроделеционен анализ (MLPA),

микрочипов анализ (aCGH), както и специализирани NGS панели за краниосиностоза. Резултатите показаха голяма честота на субмикроскопски хромозмни аберации при изследваните деца. Откриха се моногенни краниосиностози, причинени от неописани до момента мутации. За пръв път се описаха асоциации между различни генетични дефекти (хромозомни, микроделеционни и други) и краниосиностоза.

В резултат се постигна значително обогатяване на знанията за клиничните и генетични особености на краниосиностозата. Разшири се разбирането за множество генотип-фенотипни корелации. Изработиха се диагностични препоръки за поведение при деца с краниосиностоза.

Това е първото проучване в България с подробна морфологична и генетична характеристика на по-голяма група пациенти с краниосиностоза.

II. Литературен обзор

1. Определение и специфична терминология

Краниосиностозата е процес на преждевременна осификация и облитерация на един или няколко от черепно-мозъчните шевове [Cohen *et al.* 2000]. Краниостенозата се определя като вродена черепна деформация, характеризираща се с намален обем на черепа, лицева асиметрия и невъзможност за адекватно нарастване на краниума [Rice *et al.* 2008]. Краниостенозата е черепна деформация, най-често (но не винаги) формирана в резултат от процеса краниосиностоза. Въпреки, че *de facto*, тези термини не са еднозначни, повечето автори ги използват като синоними [Cohen *et al.* 2000; Sarovic *et al.* 2015; Jehue *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006]. С цел удобство, по-нататък в изложението те ще се използват в синонимен смисъл.

Микроцефалия е друг термин, който означава намаление на размерите на черепа (по данни от антропометричното измерване) с повече от две стандартни

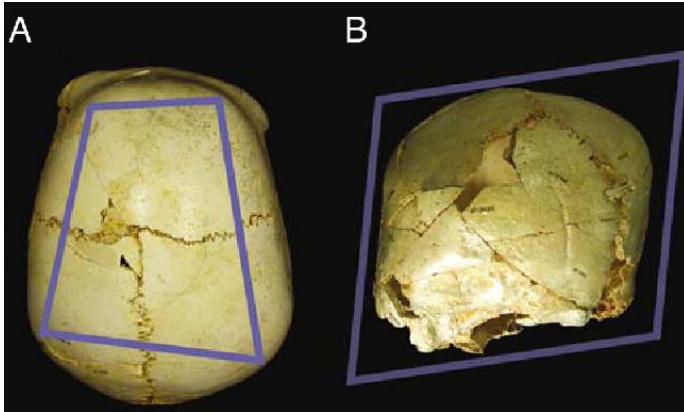
отклонения (резултат по-малък от – 2 SDS) за съответната възраст [Gorlin *et al.* 2000]. В повечето случаи микроцефалията е част от клиничните прояви на краниосиностозата, но асоциацията не е задължителна. Вкостени черепно-мозъчни шевове могат да се срещат и при деца с макроцефалия (увеличение на размерите на черепа над 2 стандартни отклонения). Това се среща сравнително често при деца със синдром на Sotos [Douglas *et al.* 2003].

Позиционната плагицефалия е черепна деформация, която възниква в резултат на продължителен престой на детето в неправилна позиция (по гръб). В този случай, не се касае за краниостеноза, тъй като не се установяват вкостени черепно-мозъчни шевове [Kumar *et al.* 2022]. Позиционната плагицефалия е „козметична“ деформация и обикновено подлежи на пълно възстановяване, при (навременно) коригиране на позицията на детето в леглото. Въпреки това тя, често представлява диференциално-диагностично затруднение, особено в случаите, когато липсват ясни анамнестични данни за обичайната поза на детето в леглото. Нерядко се налага провеждане на образно изследване (краниография, КАТ), за да се различи от ламбдовидната краниосиностоза [Kumar *et al.* 2022].

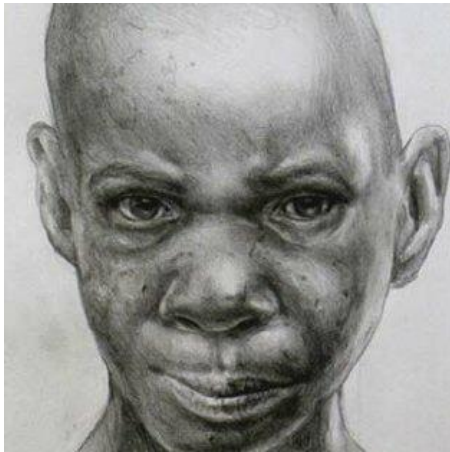
2. Исторически и културен контекст

Най-ранното описание на краниосиностоза датира от средата на Плиоцена (геоложка епоха започнала преди 5.33 милиона години и завършила преди 2.55 милиона години). Касае се за едностранна ламбдовидна краниосиностоза, причинена от преждевременна осификация на левия клон на ламбдовидния шев. Находката се нарича „Краниум 14“ [Garcia *et al.* 2010] и е част от голям археологически проект, който е проведен през 70-ти и 80-те години на миналия век в територията на днешна Испания (Sima de los Huesos, Atapuerca). Експедицията е довела до откриване на десетки скелети в различна степен на разложение, които са принадлежали на неидентифициран подтип на рода *Homo*. Краниум 14 е направил впечатление със значителна деформация на черепните кости, поради което е изследван допълнително от специализиран екип от палеопатолози. След

първичната механична реконструкция и въглеродно датиране, са проведени серии от рентгенологични и компютърно-томографски изследвания. По-късно данните са обработени чрез компютърни програми до достигане на детайлна триизмерна реконструкция на Краниум 14. Достига се до заключението, че находката принадлежи на момиче на възраст между 15-20 години от непознат човешки субтип [García *et al.* 2010]. Поради специфичната деформация на екзо- и ендокраниума са изключени по-честите причини за черепни деформации от тази епоха, а именно механични травми, анемия и рахит. Счита се, че детето (по-късно наричана от авторите „Бенямина“) е родено с тежка краниална деформация, значителна лицева асиметрия, псевдоекзофталм, протрузия на фронталната кост вдясно и съответна задна лява плагицефалия. По всяка вероятност, тези деформации са причинявали значителни дихателни и храносмилателни затруднения, както и дефекти в комуникативната „сигнализация“ (не е ясно дали този тип пра-човеци са притежавали способността за артикулирана реч). Изхождайки от рестрикцията на черепния обем и структурата на ендокраниума, се счита че Бенямина е страдала от повишено вътречерепно налягане. Това по всяка вероятност е водило до хронично главоболие, поведенчески отклонения, прогресивно увреждане на зрението и пароксизмални прояви. Фактът, че дете родено с такива увреждания е оцеляло до 15-20 годишна възраст, през Плиоцена, означава че е то е било обект на екстензивни грижи от членовете на племето. Така освен първата описана краниосиностоза, това е и първия пример за социо-биологичните отношения в историята на рода *Homini*. До този момент се е считало, че предците на модерния човек не са проявявали родителски и социални грижи за увредените членове на племената си. Посочения пример доказва голямото значение на изучаването на анатомичните особености и деформации на човешкия череп.



Фигура 1: Краниум 14 (механична реконструкция) – видима е характерната за задната плагицефалия, трапецовидна деформация на черепа [Garcia *et al.* 2010].



Фигура 2: Анатомична репрезентация на Бенямина (Краниум 14) – наблюдава се значителна лицева асиметрия и деформация на черепа. [Garcia *et al.* 2010]

От зората на човешките видове (*sp. Homo*) формата на главата е натоварена с естетично, религиозно, културно и социално значение. В различните епохи, човечеството е приемало различни анатомични особености на черепа за „предпочитани“ [Obladen *et al.* 2012]. За да постигнат желаната форма на главата, те са провокирали механична деформация на черепа, което неизменно е водило до екзогенна краниосиностоза.

В праисторическите епохи са описани множество примери за форсирана екзогенна краниосиностоза в резултат на практиката – „ритуална краниална деформация“ [Obladen *et al.* 2012]. Членове на вида *Homo neanderthalensis*, живели около 40 000 години преди новата ера, са деформирали черепите на новородените си деца (Shanidar 1, Ирак). Тези деформации са извършвани предимно чрез мануален механичен натиск, най-често от майката, който е водил до значителни деформации и краниосиностоза. Резултатните черепни форми са толкова абнормни и разнообразни, че са сред основните причини за затруднена класификация на археологическите находки. Представители вида *Homo sapiens*, също са практикували ритуални черепни деформации, около 30 000 години преди новата ера. Това се е случвало преди да бъдат опитомени първите животни, преди овладяването на огъня и метала.



Фигура 3: Деформирани неандерталски черепи с долихо- и турицефалия. Археологически находки от 40 000 пр.н.е. в територията на днешен Ирак. [Obladen *et al.* 2012]

Популярен пример от античната история е ритуалната деформация на черепите на членовете на знатната XVIII-та династия, която е управлявала Египет до 1350 година пр.н.е. Черепите на фараон Акенатон (Akhenaton), неговата съпруга Нефертити (Queen Nefertiti) и на трите им дъщери са механично деформирани от

жреците. В резултат всички членове на царския род са с тежка скафоцефалия. Този отличителен белег е бил от изключително значение за политеистичните вярвания на египетския народ. Считало се е, че само робите имат овални черепа, а за да бъде причислен към благородната каста, черепа на тогавашния човек е трябвало да бъде максимално издължен. Възможно е тежката сагитална краниосинстоза на египетските фараони да е допринасяла за сравнително краткият им живот. Също така е възможно „пророческите“ видения на египетските монарси да са резултат от различни пароксизмални инциденти, които са били тълкувани от висшите им свещеници.



Фигура 4: Фараон Акенатон, Нефертити и трите им дъщери с демонстративна скафоцефалия в резултат на екзогенна сагитална краниосиностоза. (Neues Museum, Berlin) [Obladen *et al.* 2012].

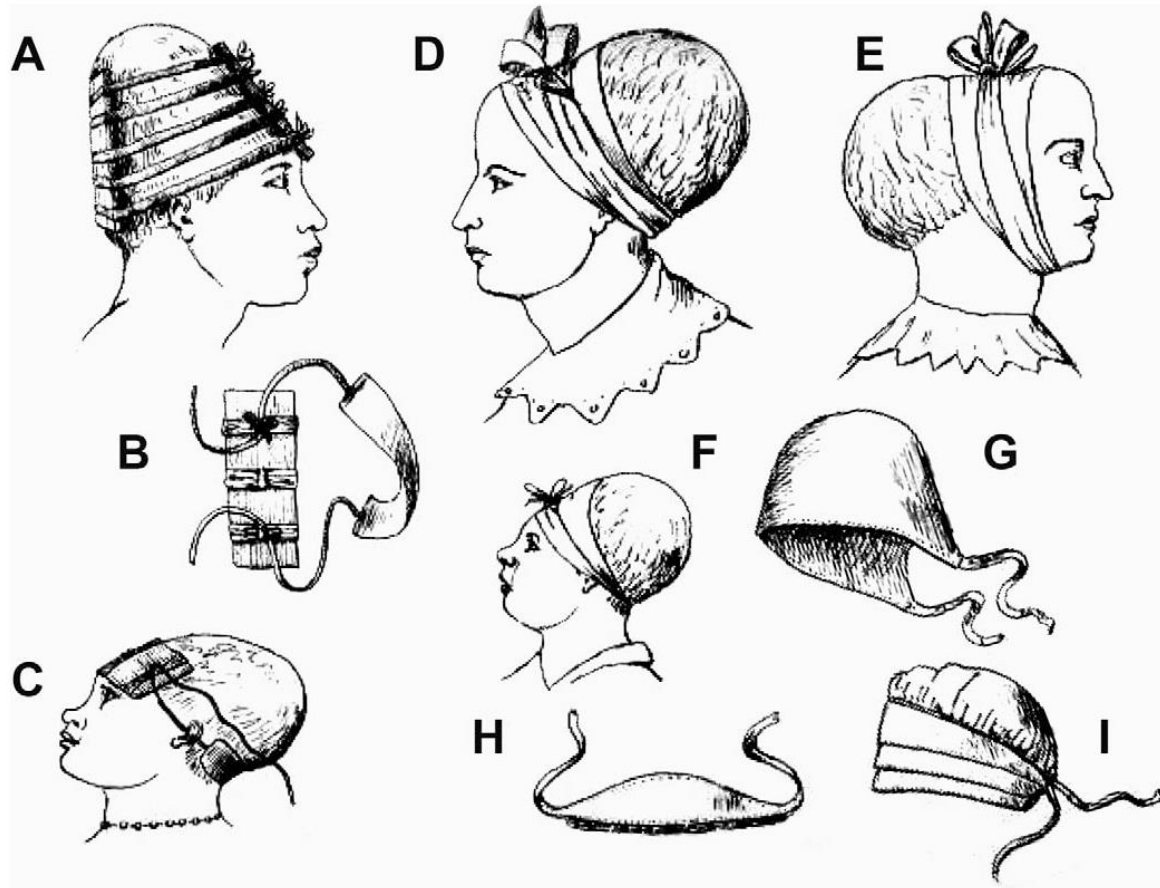
Практиката на ритуална деформация продължава да е широко разпространена в първите векове от новата ера. Различни народи и племена в Европа, Азия, Африка, Северна, Южна и Мезо-Америка, както и в Австралия са деформирали механично черепите на новородените си деца. Има данни за „наръчници по оформяне на главата“, както и множество механични приспособления за краниална деформация. На територията на Балканския

полуостров, ритуална черепна деформация е била практикувана от древните жители на днешна Македония и Тракия [Obladen *et al.* 2012].



Фигура 5: Методи и приспособления за краниална деформация от Северна Америка (вляво) и Индонезия (вдясно), датирани от I до V-ти век [Obladen *et al.* 2012].

През Средновековието, практиката за „подобряване“ на главите на новородените деца не само продължава, но става част от задълженията на акушерите. Учебниците и приспособленията се усложняват и разнообразяват.



Фигура 6: Приспособления за форсирана черепна деформация от VII до XVII-ти век [Obladen *et al.* 2012].

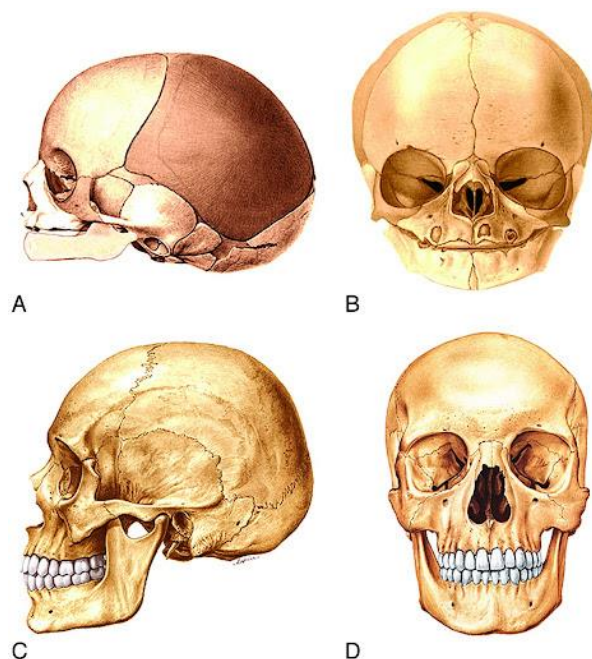
След големият прогрес в разбирането за човешката анатомия, през Ренесанса (Андреа Везалий – “*De humani corporis fabrica*”), първо в Европа, а по-късно и в останалите континенти, се установяват негативните ефекти от форсираната черепна деформация. Започват организирани усилия за прекратяване на ритуалните и акушерски патологични практики. Първото системно, научно описание на краниосиностозата и резултатните черепни деформации е направено от Рудолф Вирхов през 1892-ра година. Той предлага анатомична и клинична класификация, която стои в основата на модерните разбирания за тези черепни дефекти. Въпреки неговите (и на стотици други учени) усилия, архаичните практики за „оформяне“ на главата на новороденото продължават и в днешно време.

Първите системни описания и генетични изследвания на деца краниосиностоза в България са проведени от проф. Емил Симеонов. Наследен, по-късно от проф. Симеон Бояджиев, който продължава кариерата си във Флорида (САЩ). Там основава първия световен регистър за краниосиностоза, който продължава да расте и съдържа около 800 семейства до момента. Стъпвайки на основите положени от тях, въоръжени с модерните методи на клиничната генетика, ние проведохме първия мащабен генетичен скрининг на български деца с краниосиностоза.

3. Ембриогенеза и анатомия на черепа и черепно-мозъчните шевове

Развитието на човешкия череп започва около 23-26 дни след концепцията, когато определена мултипотентна група клетки мигрира от дорзалните части на невралната тръба (ектодерма) към краниалната ѝ област. Тази група клетки е част от невралния гребен и дава началото на краниофациалните структури на ембриона. Според съвременните разбирания за ембриогенезата на черепните тъкани, фронтална и окципитална кост са с ектодермален произход, а останалите произлизат от мезодермата [Al Rekabi *et al.* 2016; Lattanzi *et al.* 2017; Graham *et al.* 2016].

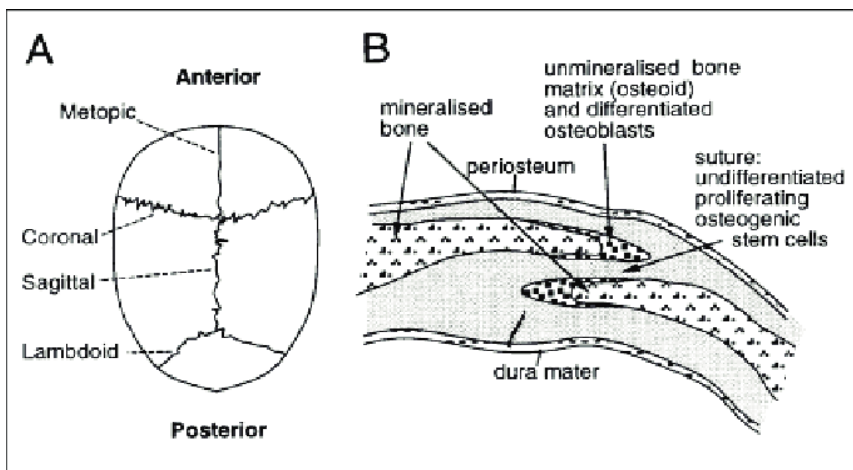
Нарастването на черепа е тясно свързано с нарастването на подлежащия мозък. Черепа се разделя на две анатомични части: неврокраниум (мозъков череп, който се състои предимно от костите на калварията) и висцерокраниум (лицев череп, който е изграден от костни и хрущялни структури на лицето и черепната основа). Отношението на обемите на лицевия към мозъковия череп е различно в различните възрасти. В детска възраст мозъковия череп доминира за сметка на лицевия [Glass *et al.* 2004].



Фигура 7: Сравнителна анатомична схема на черепа на новородено (А и В) и на възрастен човек (С, D) [Graham *et al.* 2016]

Развитието на калварията започва около 6-та гестационна седмица и се осъществява чрез интрамембранна осификация [Helfer *et al.* 2016]. За разлика от повечето кости, черепните структури преминават през етап на първична хондрогенеза, след което протича остеогенезата. В точките на първична осификация (осификационни локуси), мезенхимните остеопрогениторни клетки се диференцират в остеообласти, които произвеждат протеините на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) и инициират минерализация [Merrill *et al.* 2006]. Остеогенезата на калварията протича в радиално направление с начало в осификационните локуси. При това радиално разрастване се оформят т.нар. остеогенни фронтове. В тях се намират множество недиференцирани, пролифериращи остеопрогениторни клетки, но се срещат и диференцирани остеообласти и остеокласти [Merrill *et al.* 2006]. Съществува фино оркестриран баланс между диференцирани и недиференцирани клетки, както и между остеообласти и остеокласти, което

осигурява специфичните функции на тези черепни структури. Когато радиално прогресиращите остеогенни фронтове на различни черепни кости се срещнат се образуват черепно-мозъчните шевове (около 16-18-та гестационна седмица) и фонтанели [Helfer *et al.* 2016]. Сутурите са комплексни структури, които се състоят от: два граничещи остеогенни фронта, неосифицирана съединителнотъканна мембрана между тях, твърдата мозъчна обвивка (*dura mater*) и периоста на черепа [Helfer *et al.* 2016].



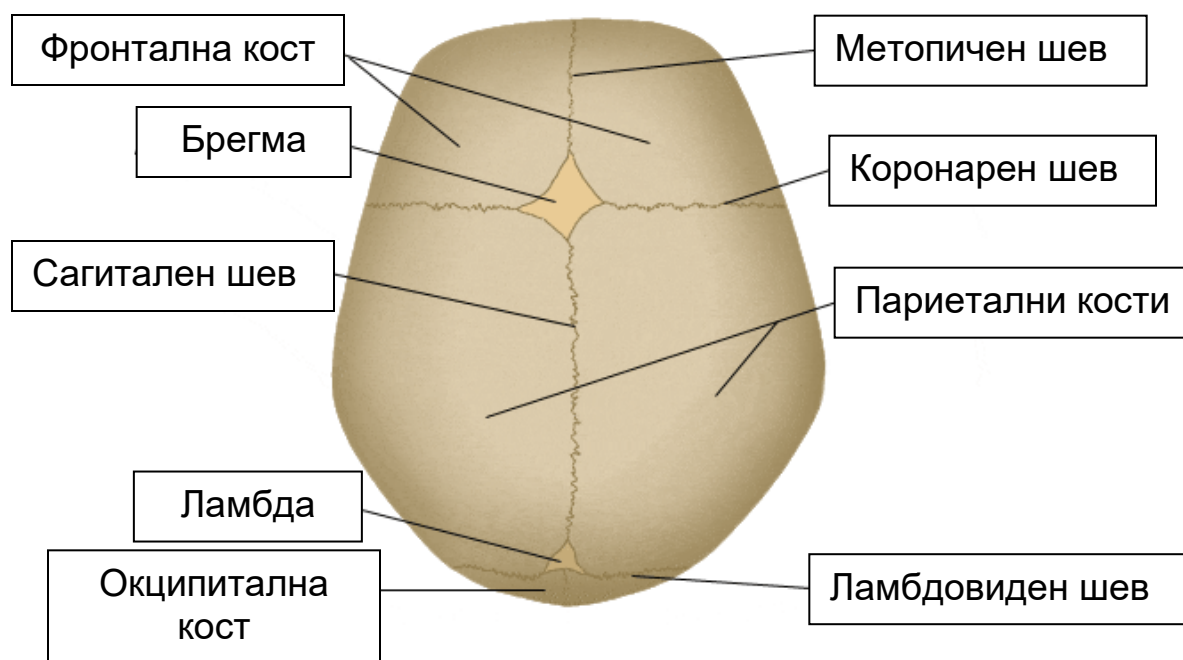
Фигура 8: Основните сутури на калварията – А и напречен срез, представящ анатомичните части на черепно-мозъчните шевове – В [Wilkie *et al.* 2006].

Черепните сутури изпълняват множество функции, сред които най-съществени са: осигуряване на адекватно и синхронизирано нарастване на черепа и главния мозък; осигуряване на необходимата пластичност на черепа на плода при преминаването му през родилния канал при процеса на естествено раждане; абсорбция на механичен натиск и вибрации с цел защита на вътречерепните тъкани и органи [Down Leitch, 2010]. Регулацията на черепно-мозъчните шевове е изключително сложен и многокомпонентен процес, който зависи едновременно от генетични, епигенетични, ендокринни, молекулни, механични и анатомични фактори. Всички

тези механизми и структури трябва да работят в динамична хармония, за да се постигнат физиологичните и анатомични функции на сутурите.

Основните черепно-мозъчни шевове на калварията са: метопичен, сагитален, коронарен и ламбдовиден [Graham *et al.* 2016]. Метопичният шев се простира от глабелата до голямата фонтанела, разделяйки фронталната кост на две симетрични части. Физиологичната осификация на този шев настъпва най-рано – около 9 месечна възраст. Коронарният шев ограничава фронталната от париеталните и темпоралните кости и се разделя на лява и дясна половина от метопичния шев. Сагиталния шев започва от голямата фонтанела, преминава медиално между двете париетални кости и достига ламбдовидния шев, където участва във формирането на малката фонтанела. Ламбдовидния шев се намира на границата на сквамата на окципиталната кост с париеталните коси. Разделя се на две симетрични половини (ляв и десен клон) от малката фонтанела. Окончателната облитерация на коронарния, сагиталния и ламбдовидния шев нормално настъпва във в третата декада от живота. Описаните кости и сuture формируют няколко фонтанели – съединително-тъканни структури, разположени в граничните области на черепно-мозъчните шевове. Фонтанелите изпълняват функцията на резерв за абсорбция на механичен натиск, вибрации и необходима деформация на детския череп. Предната (голяма) фонтанела или Брегма има неправилна ромбовидна форма, и нормално се намира на нивото на черепните кости. Брегмата се използва за анатомична ориентация при акушерските манипулации за подпомагане на естественото раждане. Палпацията на тази фонтанела е задължителна част от физикалния преглед при новородени деца и кърмачета. Оценяват се нивото (под или над черепните кости), ръбовете (твърди, меки), формата и размерите на Брегмата, което дава ценна информация за състоянието на децата. Осификацията на голямата фонтанела настъпва естествено между 9-ти и 15-ти месец. Задната (малка) фонтанела, наричана още Ламбда, обичайно има неправилна триъгълна форма и често е осифицирана почти веднага след раждането. При недоносени деца или деца с краниални деформации малката фонтанела може да остане отворена до 3 месец (а в някои случаи и до по-късно). Антеролатералната – „Птерион“ и

дорзолатерлната „Астерион“ обикновено са затворени при раждането [Graham *et al.* 2016].



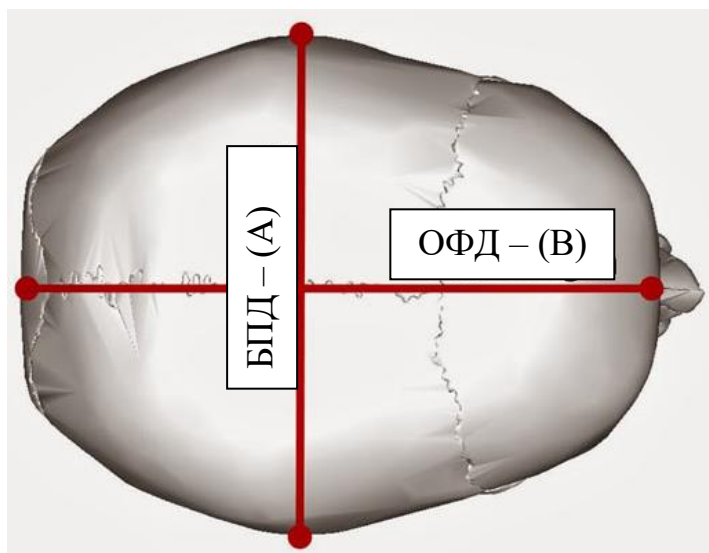
Фигура 9: Анатомия на калварията, сутурите и фонтанелите [Graham *et al.* 2016]

При антропометрията на детския череп се извършват няколко измервания за оценка на размерите и обема на краниума, които стават база за обективно сравнение и системно проследяване. Основният размер е обиколка на главата, която се измерва в сантиметри (чрез различни устройства) през най-широките част на черепа (туберите). Класическият метод за измерване на обиколка на главата е чрез мек медицински метър. Този подход е труден за приложение в детска възраст с възможност за неточности (двигателно неспокойствие на детето, грешна позиция). Значително по-точни и постоянни резултати се получават при измерване на главата със специално ригидно устройство (подобно на шлем) или чрез лазерен метър. За да бъде предмет на системна оценка и сравнение, за получената стойност за обиколка на главата се изчислява индекс на стандартно отклонение (SDS). За нормални се считат стойности на SDS за глава от -2 до +2. При стойности по-малки от -2 говорим за микроцефалия, а съответно при стойности по-големи от

+2 за макроцефалия (виж точка „Определение и специфична терминология“). Микроцефалията е типичната и очаквана находка при деца с краниосиностоза, но не е задължителна. Възможно е да се наблюдава и макроцефалия, но тази асоциация е много по-рядко срещана.

Другият основен антропометричен показател на черепа е т.нар. краниален индекс (или цефален индекс) [Graham *et al.* 2016; Aviv *et al.* 2002]. Това е съотношението на максималната ширина на главата на детето (бипариетален диаметър), умножена по 100 и след това разделена на максималната му дължина (окципитофронтален диаметър). В норма, стойностите на краниалния индекс се движат между 76-81% (нормоцефалия). При стойности над 81 % се говори за брахицефалия, а при стойности под 75 % – за долихоцефалия.

Краниален индекс = Бипариетален диаметър x 100 /
Окципитофронтален диаметър



Фигура 10: Краниален индекс = бипариетален диаметър - БПД (А) x 100, разделен на окципитофронталния диаметър - ОФД (В) [Graham *et al.* 2016].

С цел яснота на резултатите от клиничните находки при децата с краниосиностоза, в настоящият дисертационен труд, ние използвахме метода за измерване на обиколка на главата с мек медицински метър.

4. Специфични лиганди и рецептори, регулиращи състоянието на черепно-мозъчните шевове

Комплексният, интимен, молекулно-обусловен баланс в регулацията на черепно-мозъчните шевове започва да се изяснява едва през последните две десетилетия [Бояджиев *и сътрудници* 2015]. Интеракциите между определени специфични молекули и техните рецептори стои в основата на сутуралната регулация. Някои от тези фактори са изследвани екстензивно, което е довело до разкриване на значението им за преждевременната сутурална осификация [Twigg *et al.* 2004; Varik *et al.* 2015]. Такива са фибробластния растежен фактор (FGF), трансформиращия растежен фактор – бета (TGF-beta), инсулино-подобния растежен фактор (IGF) [Hunenko *et al.* 2001; Kimonis *et al.* 2007]. Ролята им в развитието на ендогенна краниосиностоза е изучена до голяма степен (Таблица 1).

Други специфични молекули са BMPs и Msh homeobox 2(Msx2), чиято роля в биологията на черепно-мозъчните не е изучена напълно. Тези фактори са проостеогенни и въздействат на остеобластите [Justice *et al.* 2012]. Още по-слабо изучени са молекулните фактори, които модулират остеокластогенезата и активацията на остеокластите, като цитокиновия рецептор-активатор на нуклеарен фактор – карра В лиганд – RANKL (Таблица 1) [Wilkie *et al.* 2006].

Таблица 1. Молекулни активатори и инхибитори на сутурална осификация [Sundaresan *et al.* 2019]

АКТИВАТОРИ	ИНХИБИТОРИ
TGF-beta 3	FGF 2, 3, 4
Noggin	FGF 1

RANK, RANKL	TGF-beta 1, beta 2
Twist1	IGF-1, 2
	Runx2
	BMP 2, 3, 4
	Axin 1, 2
	Msx 1, 2

Фибробластен растежен фактор (FGF) и неговия рецептор (FGFR)

Семейството на фибробластните растежни фактори включва повече от 19 лигада, които се свързват с три специфични рецептора (FGFR 1, 2 и 3). Всеки FGF лиганд може да се свързва с различни рецептори, а всеки рецептор може да приема различни лиганди (Фигура 11).

Фибробластния растежен фактор тип 2 (FGF-2) е лиганда с най-висока концентрация. Биологичната му роля се състои в: индукция на остеобластната пролиферация и диференциация; индукция на хондроцитната диференциация; индукция на осификация както *in vivo*, така и *in vitro*. Като резултат (доказано и в лабораторни условия) FGF-2 активира фузията на черепно-мозъчните шевове [Hunenko *et al.* 2001].

Barik и сътрудници доказват, че FGF-2 се експресира локално от dura mater както преди, така и след осификация на сутурите. Установен е и дефицит на FGF-2 сигнализация в съседните (на предварително вкостени) шевове, което вероятно е механизъм за краниална акомодация към наличието на краниосиностоза [Barik *et al.* 2015].

Свръхфизиологичната FGF-2 сигнализация, парадоксално, води до инхибиция на остеногенезата, което се наблюдава и при субфизиологични нива на FGF-2. Изглежда, че само постоянната, физиологична концентрация на FGF-2 води до осификация на черепните шевове. Излишъкът на FGF-2 сигнализация води до поддържане на отворени шевове чрез даунрегулация на рецепторите – FGFR2. Друга функция на FGF-2 е директна и дозово-зависима стимулация на експресията

на TGF-beta 1 в остеобластите и активиране на проостеогенният им ефект [Barik *et al.* 2015].

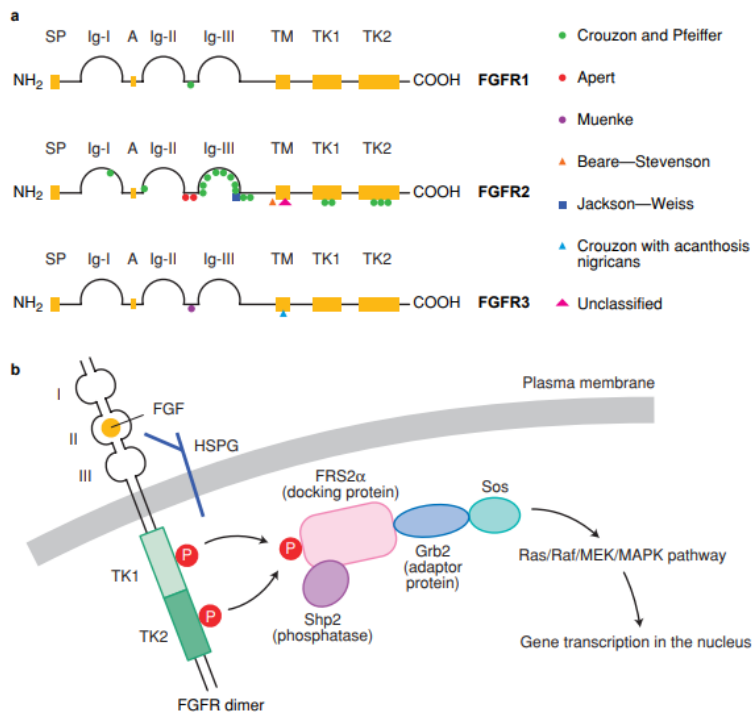
Свърхекспресията на FGF-3 и FGF-4, също води до повишен риск от преждевременна осификация на черепните шевове [Agochukwu *et al.* 2012].

Освен многобройните лиганди, в биологичната регулация на калвариата, са включени и три рецептора: FGFR1, FGFR2 и FGFR3 [Barik *et al.* 2015]. Iseki и сътрудници изследват ролята на тези рецептори в развитието на калвариата при опитни животни (лабораторни мишки). Авторите установяват, че експресията на FGFR2 съвпада със зоните на интензивна остеогенна пролиферация, и отсъства в зоните на остеобластна диференциация (където активно се експресира FGFR1) [Iseki *et al.* 2002; Britto *et al.* 2001]. FGFR3, от друга страна, се експресира както в остеогенните така и в хондрогенните региони на скелета, и заедно с FGFR2 води до остеогенна пролиферация [Lajeunie *et al.* 2001].

Някои FGFR мутации (FGFR2 при синдрома на Apert) водят до повишен афинитет на мутантния рецептор, което води до ексцесивна сигнализация, повишена остеобластна диференциация и преждевременна калвариална осификация [Kunwar *et al.* 2017; Conrady *et al.* 2022].

Рецепторите за фибробластните растежни фактори се експресират в различна степен в различните черепно-мозъчни шевове. Мутации в различните FGFR, водят до осификация на различни шевове. FGFR2 е най-широко експресираният рецептор, но също така и най-често засегнатия от мутации. В резултат може да се получи синостаза на коронарния, метопичния, сагиталния и ламбдовидния шев. Мутациите на *FGFR3* засягат само коронарния и метопичния шев, а тези на *FGFR1* (също така на *Twist1* и *EFNB1*) обикновено засягат само коронарната сутура [Kunwar *et al.* 2017].

Изброените лиганди и рецептори се експресират широко и извън костно-скелетната система. Според някои автори, нивата на експресия на FGF-рецепторите 1-4 могат да се използват като биомаркер за сквамозен белодробен карцином [Moes-Sosnowska *et al.* 2022]. Това доказва значителното разпространение и значение на тези молекули.



Фигура 11. Структура и функция на фибробластните растежни фактори (FGF) и техните рецептори (FGFR) [Bonaventure *et al.* 2003]

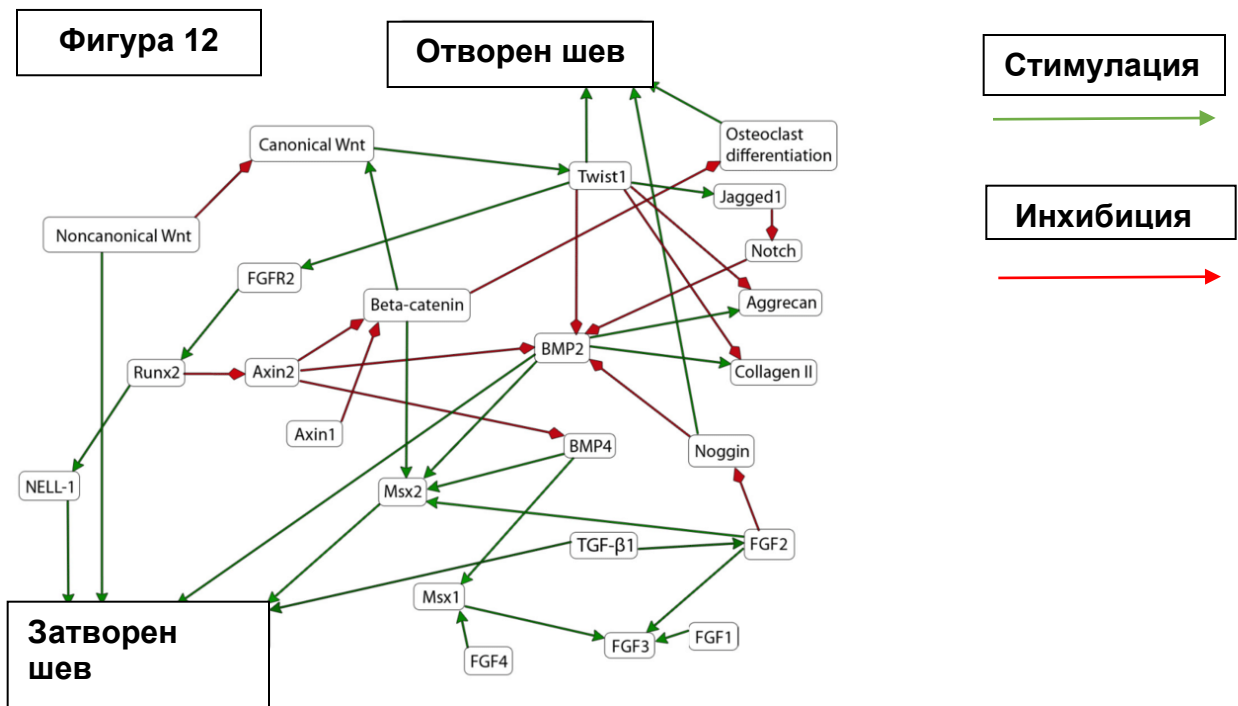
Трансформиращ растежен фактор – бета (TGF-beta)

TGF-beta се състои от три изоформи: TGF-beta1, TGF-beta2 и TGF-beta3. Функциите на TGF-beta са многобройни и включват: стимулация на остеобластната пролиферация и синтез на колаген, инхибиция на остеокластната функция [Hunenko *et al.* 2001].

Експресията на TGF-beta1 е увеличена значително в шевовете, малко преди и по време на осификацията и е значително редуцирана в неосифициращи сутури. Това доказва централната роля на TGF-beta1 в регулацията на краниалните шевове. TGF-beta2 и IGF-1 също се експресират интензивно в остеобластите по остеогенните фронтове на осифициращите шевове. Експресията на TGF-beta3 е намалена във вкостените шевове и е повишена в отворените, което показва ролята му за поддържане на тези шевове в неосифицирано състояние [Hunenko *et al.* 2001].

Инсулиноподобен растежен фактор (IGF)

IGF съществува в две изоформи – IGF1 и IGF2, които се експресират почти изключително в твърдата мозъчна обвивка и в мезенхима на осифициращите шевове. Тази експресия е увеличена в подлежащата дупа около 2-10 дни преди осификацията, и в последствие в мезенхима в продължение на 15-20 дни по време на процеса. Bradley и сътрудници установяват, че интеракцията между дупа матер и краниалния шев, може да се медира чрез паракринна сигнализация от дурални растежни фактори като IGF1 и IGF2 [Bradley *et al.* 1996].



Фигура 12: Връзки и взаимодействия между различните лиганди и рецептори, участващи в регулацията на краниалните шевове [Sarovic *et al.* 2015].

Комплексните интеракции между различните молекули и техните рецептори, участващи в регулацията на черепно-мозъчните шевове са резюмирани в Фигура 12 [Bradley *et al.* 1996].

5. Класификация

Съществуват много различни класификации на краниосиностозите, но няма приета единна такава до момента в световен мащаб. Основното разграничение, което повечето автори правят, е базирано на етиологията и поделя синостозите на ендо- и екзогенни [Cohen *et al.* 2001; Jehee *et al.* 2007; Wilkie *et al.* 2006; Бояджиев *и сътр.* 2015].

Ендогенните синостози се поделят на ендокринни (метаболитни) и генетични. Ендокринни и метаболитни причини за краниосиностоза могат да бъдат всички заболявания засягащи калциево-фосфорната обмяна, скелетните дисплазии, X-свързана хипофосфатемия, витамин D резистентен рахит, витамин D недоимъчен рахит, хипофосфатазия и псевдохипопаратиреоидизъм [Currarino *et al.* 2007]. Други заболявания също могат да бъдат причина за краниосиностоза като някои анемии (таласемия).

Генетичната краниосиностоза е хетерогенна група състояния в чиято основа стоят различни генетични дефекти, водещи до преждевременна осификация на черепно-мозъчните шевове [Бояджиев *и сътр.* 2015]. Това може да се дължи на класически хромозомни аберации, микроделеции и дупликации, субмикроскопски хромозомни пренареждания, патологични генни варианти, както и на дефекти в сигналните молекули, транскрипционните фактори и рецепторите за фибробластните растежни фактори [Cohen *et al.* 2001; Jehee *et al.* 2007; Wilkie *et al.* 2006; Бояджиев *и сътр.* 2015]. Посочените разнообразни генетични и епигенетични дефекти водят до изместване на баланса в черепно-мозъчните шевове към масивна и преждевременна остеогенеза. Това може да се дължи на провокиране на диференциацията на остеопрогенитроните клетки,

на повишена функция на остеобластите или на потискане на функцията на остеокластите [Passos-Bueno *et al.* 2008].

Генетичните краниосиностози се поделят допълнително на синдромни (когато са част от стигмите на определен синдром) и на несиндромни (когато синостозата е изолирана и единствена деформация) [Sawh-Martinez *et al.* 2019]. Несиндромните краниосиностози се срещат в около 80%, а синдромните в 20% от случаите. Основната разлика между синдромните и несиндромните краниосиностози се състои в това, че при последните дефектните генетично-молекулярни механизми, причиняващи ранна осификация, са локализирани изключително в рамките черепните шевове. При синдромните краниосиностози, тези дефекти се разпростират и в други органи и тъкани – най-често други скелетни дефекти (небце, пръсти, дълги кости) и по-рядко провокират мекотъканни аномалии [Lee *et al.* 2016]. Генетичните основи на несиндромната краниосиностоза са комплексни и остават неуточнени в голям процент от случаите [Jehee *et al.* 2008]. Няколко проучвания [Ko *et al.* 2016; Bonaventure *et al.* 2003; Lattanzi *et al.* 2012; Ibarra-Arce *et al.* 2020] установяват дефекти в определени гени (*FGFR 1, 2 u 3; TGF-b I, II; IGF1R; Twist1; RunX2; FGF7; SFRP4; VCAM1*), но те се припокриват с гените отговорни за част от синдромите краниосиностози, което значително усложнява генетичната диагностика. Други автори [Chun *et al.* 2003] оспорват генетичната етиология и предполагат, че влиянието на фактори от външната среда (неправилна позиция в леглото, пелвио-фетални диспропорции, черепно-мозъчни травми) играят основна роля при възникването на несиндромните краниосиностози. Интересен е фактът, че мутации в едни и същи гени засягат различните черепни шевове (коронарен, метопичен, сагитален и ламбдовиден) по различен начин. Това показва, че експресията на тези гени е различна в рамките на отделните сутури на калвалията. Известни патогенни варианти в гена *FGFR2* например, не засягат всички шевове, а често се проявяват по-изразено в един или два от тях. Различията в експресията и припокриването с гените, отговорни за възникването на синдромна краниосиностоза, значително затруднява

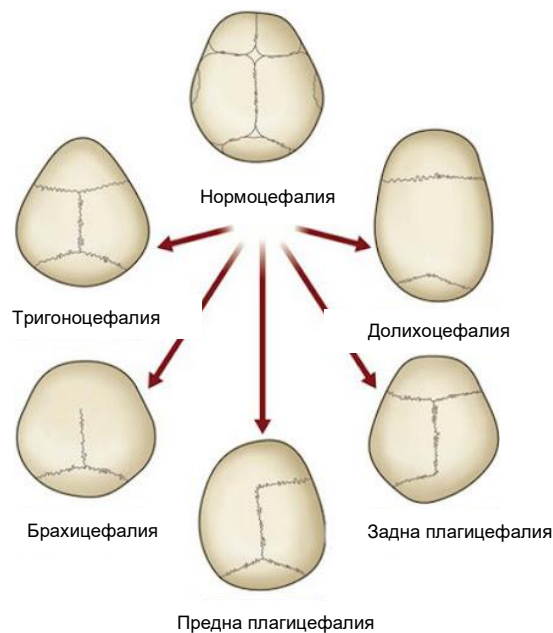
диагностиката и верификацията на случаите с несиндромна краниосиностоза. Последната е обект на множество генетични проучвания [Johnson *et al.* 2008].

Специфична подгрупа на синдромните синостози са т.нар. моногенни краниосиностози. Те се дължат на патогенни варианти в определени гени и с малки изключения се унаследяват по автозомно-доминантен механизъм (някои се унаследяват по автозомно-рецесивен и X-свързан механизъм). Тези синдроми са изключително редки и се характеризират със значителна клинична хетерогенност. Някои от отговорните гени са: *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *CD96*, *EFNB1*, *FLNA*, *GLI3*, *IHH*, *MSX2*, *POR*, *RAB21*, *RECQL4*, *SKI*, *SOX9*, *TGFBR1*, *TGFBR2* и *TWIST1* [Goos *et al.* 2018]. Много други гени, асоциирани със синдромни и несиндромни краниосиностози са обект на екстензивни изследвания.

Екзогенните краниосиностози също са изключително хетерогенна група черепни деформации. Сред най-честите етиологични фактори е интраутеринната оклузия, която може да възникне при многоплодна бременност, олигохидрамнион, фетална макроцефалия и анатомо-физиологични аномалии на матката [Delahaye *et al.* 2003]. При тези състояния се създава външен механичен натиск върху костите на черепа на ембриона, което може да доведе до компресия и синостоза. Друга причина за екзогенна краниосиностоза може да бъде родова травма на черепа, провокирана от пелвио-фетална диспропорция, нетипично предлежание на плода и неправилно приложение на методи за подпомагане на раждането (мануална екстракция, форцепс, тракция) [Blaser *et al.* 2015]. Черепно-мозъчни травми и постоянен механичен натиск, след раждането, също могат да доведат до екзогенна краниосиностоза.

Според броя на засегнатите сuture, синостозите се поделят на прости (вкостяване на един шев) и комплексни (едновременна осификация на два или повече от черепно-мозъчните шевове). При преждевременна осификация на два шева говорим за бисиностоза, на три засегнати шева – трисиностоза или пансиностоза [Flaherty *et al.* 2016; Fearon *et al.* 2014; Derderian *et al.* 2012].

Друга често използвана класификация поделва краниостенозите според анатомичния субстрат (засегнатия шев) (Фигура 13) [Governale *et al.* 2015]. Различават се коронарна, сагитална, метопична и ламбдовидна синостоza. Могат са се наблюдават и разнообразни комбинации от гореизброените. Коронарната и ламбдовидната синостоza могат да бъдат едно- или двустранни. Всяка от тези синостоzi води до характерни деформации на черепа, които винаги настъпват перпендикулярно на първично засегнатия шев.



Фигура 13: Нормоцефалия и основните патоанатомични варианти на черепа при краниосиностоza [Governale *et al.* 2015].

При двустранна синостоza на коронарния шев се развива брахицефалия (краниална деформация, характеризираща се със скъсен предно-заден и разширен бипариетален диаметър) [Ita *et al.* 2022].

При едностранна синостоza на този шев се развива лява или съответно дясна предна плагицефалия (асимтерична краниална деформация, провокирана от едностранна сутурална синостоza) [Kumar *et al.* 2022].

При синостоза на сагиталния шев се оформя долихоцефалия – краниална конфигурация, при която предно-задния размер на черепа е значително увеличен. Скафоцефалията е екстремна разновидност на долихоцефалията, която се среща рядко, но винаги е патологична.

При едностранна синостоза на ламбовидния шев се оформя съответно лява или дясна задна плагицефалия.

При синостоза на метопичния шев се оформя тригоноцефалия (краниална деформация с „триъгълна“ форма на калварията, придружена от костна протрузия по хода на осифицирания шев) [Fernández-de Thomas *et al.* 2021].

При по-редките сложни краниосиностози (би- и трисиностози) се получават разнообразни и тежки черепни деформации, които са трудни за системна класификация. Някои от познатите са: турицефалия (куловиден череп), оксифалия (конусовиден череп), детелиновиден череп (cloverleaf skull, Kleeblattschadel) и други [Rahman *et al.* 2017]. Клиничните прояви при тези черепни деформации се манифестират по-рано и тежко (психо-моторно изоставане, епипептични пристъпи, зрителни и слухови увреждания) и често налагат неврохирургична интервенция.

6. Честота

Кумулативната честота на краниосиностозата в световен мащаб е около 1 на 2400-2500 новородени деца (някои автори дават честотата като 4-5 на 10 000 новородени деца) [Cohen *et al.* 2000; Sarovic *et al.* 2015; Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006]. В това число се включват всички видове краниосиностоза - екзогенни и ендогенни (генетични и ендокринни). Генетичните синостози се разделят на несиндромни (80% от случаите) и синдромни (20% от случаите).

Честотата на несиндромните краниосиностози е около 1 на 2000 до 1 на 3 000 деца, а на синдромните около 1 на 10 000 деца [Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006].

Специфичната подгрупа на моногенните синостози е с различна честота в зависимост от конкретния синдром: 1 на 30 000 при синдрома на Muenke, 1 на 60

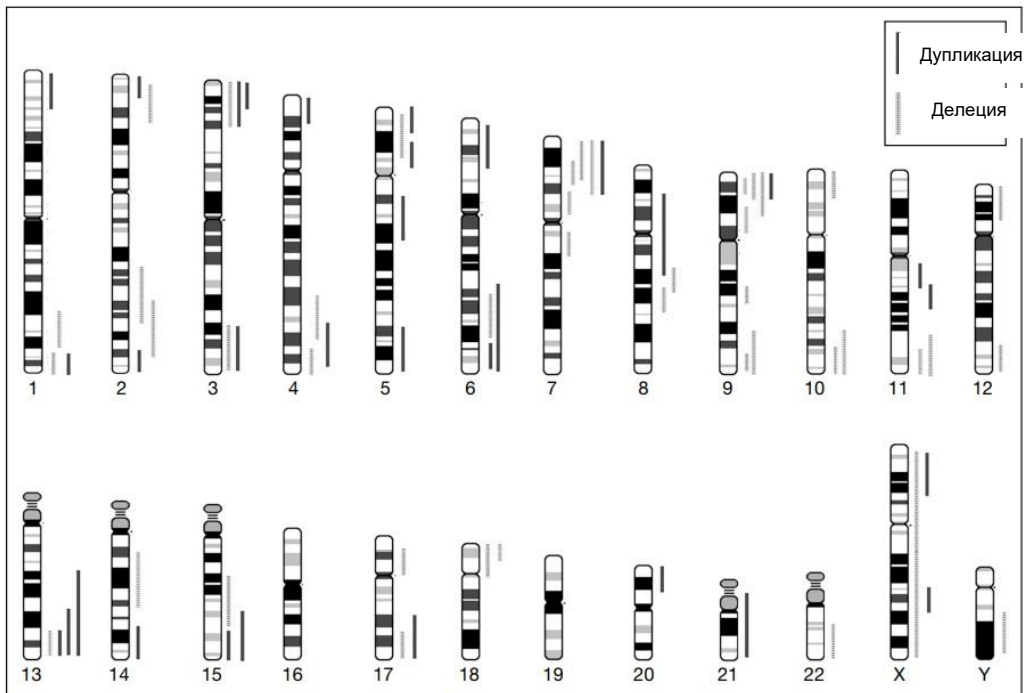
000 при синдрома на Crouzon и 1 на 100 000 при синдрома на Pfeiffer [Kruszka *et al.* 2016; Conrady *et al.* 2022].

Честотата на засягане на различните шевове са: коронарна (40% от случаите), сагитална (35% от случаите), метопична (15 %) и ламбдовидна (10%) [Cohen *et al.* 2000; Sarovic *et al.* 2015; Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006].

7. Етиология

7.1 Хромозомни аберации

Описани са многобройни и разнообразни хромозомни аберации асоциирани с краниосиностоza, включително различни делеции и дупликации в практически всяка хромозома (виж фигура 14) [Passos-Bueno *et al.* 2008]. Големият брой хромозомни дефекти и тяхната повсеместна локализация в човешкия кариотип доказва значителната генетична хетерогенност на краниосиностозата. Също така доказва необходимостта от провеждане на конвенционално кариотипиране при всички деца със синдромна синостоza. По литературни данни, хромозомни аберации се срещат при 14-16% от децата с краниосиностоza [Passos-Bueno *et al.* 2008; Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006].



Фигура 14 – Схема на човешки кариотип, на която са обозначените хромозомните делеции и дупликации, асоциирани с краниосиностоza [Passos-Bueno *et al.* 2008].

Хромозомните аберации се срещат по-често при синостоzi по срединната линия (засягащи метопичния и сагиталния шев) [Lattanzi *et al.* 2012]. Съществува високостепенна асоциация между краниосиностоza и дупликация 13q21-q34, делеция 7p15-p21, делеция 9p21-p24 и делеция 11q23-25. Увеличава се и броят на децата с краниосиностоza асоциирана с делеция 22q11, делеции и дупликации на хромозомния локус 1p36 [Lattanzi *et al.* 2012]. Метопична синостоza е описана при деца с делеции в съответно 9-та и 11-та хромозома (del 9p22, del 11q23.3) [Lattanzi *et al.* 2012]. Коронарна краниостеноза е асоциирана с дупликации и делеции в дългото рамо на 22-ра хромозома (22q11.2) [Passos-Bueno *et al.* 2008]. Комплексни синостоzi са описани при деца с интерстициални дупликации на дългото рамо на 11-та хромозома (dup 11q11-q13.3) [Lattanzi *et al.* 2012]. Разнообразни реорганизации в много други хромозоми (5-та, 6-та, 15-та и 17-та) също могат да бъдат причина за проста и комплексна синостоza [Lattanzi *et al.* 2012].

Разпознаването на определени, кандидат-гени, в рамките на споменатите хромозомни региони е затруднено поради хетерогенността на находките. Генотипно-фенотипни корелации също се дефинират трудно – от една страна поради сравнително малкия брой съобщени случаи, а от друга поради това че краниосиностоза не се установява при всички пациенти с дадена хромозомна аберация. Това предполага наличието на допълнителни генетични, епигенетични и външни фактори, които променят пенетрантността на хромозомните краниосиностози. Интересен е фактът, че няма рапортувана асоциация между краниосиностоза и аберации на хромозома 19 [Lattanzi *et al.* 2012; Passos-Bueno *et al.* 2008].

Асоциацията на краниосиностоза с „класическите“ хромозомни болести се наблюдава рядко. Вессега и сътрудници съобщават случай на 5 годишно момиче с нисък ръст, генитална хипоплазия и дисморфични стигми, сред които е описана и скафоцефалия [Вессега *et al.* 2021]. Проведеното цитогенетично изследване (конвенционално кариотипиране) показва - 45,X,i,(X)(q10), който е потвърден на втори етап чрез FISH и aCGH. Това поставя диагнозата синдром на Търнър (с изохромозома X). Краниография (рентген и КТ) доказват и сагитална краниосиностоза. Скелетните аномалии при пациенти с Търнър се свързват до голяма степен с хаплоинсуфициенция на *SHOX* (short-stature homeobox) гена. Авторите [Вессега *et al.* 2021] съобщават, че черепни деформации се наблюдават по-често при случаи на Търнър с изохромозома X. Предполага се и определено взаимодействие на *SHOX* и *FGFR3* гените, което е довело до нетипичната за синдрома сагитална краниосиностоза.

Siu и сътрудници съобщават два случая на деца със синдром на Даун (момиче на 2 години и момче на 4 месеца) и едностранна синостоза на коронарния шев с демонстративна предна дясна плагицефалия [Siu *et al.* 2014]. Това е пример за сравнително рядката асоциация на краниосиностоза и тризомия 21. Все още връзката между тези състояния (ако има такава) не е изяснена и е обект на интензивни проучвания. Изказват се хипотези, че връзката между преждевременната сутурална осификация и синдрома на Даун се дължи на дефекти в гените: *DSCR1*, *DYRK1A*, *COL18A1* [Siu *et al.* 2014].

7.2 Микроструктурни (субмикроскопски) хромозомни аберации

По литературни данни, честотата на субмикроскопски аберации и микроделеции при деца със синдромна краниосиностоза варира в широки граници – от 6.7 до 28% [Passos-Bueno *et al.* 2008; Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006]. Както при хромозомните аберации, при 85% субмикроскопските генетични дефекти най-често засягат сагиталния и метопичния шев (синостози по срединната линия) [Jehee *et al.* 2005; Jehee *et al.* 2008; Rosenberg *et al.* 2006]. За установяването на тези аберации са необходими методите: аCGH (сравнителна геномна хибридизация) и MLPA (мултиплексна лиганд-зависима амплификация) – виж Методи и материали. Те често се използват в тандем за уточняване на комплексните генетичните находки. Находките са многобройни, но изолирани, хетерогенни и несистемни, което затруднява идентифицирането на кандидат гени и оформянето на генотип-фенотипни корелации [Хаджидекова, 2011; Авджиева-Тзавелла, 2012].

Jehee и сътрудници провеждат генетичен скрининг при 45 деца със синдромна краниосиностоза в Бразилия, като използват комбинация от конвенционално кариотипиране, MLPA и сравнителна геномна хибридизация [Jehee *et al.* 2005; Jehee *et al.* 2008]. Генетична верификация е постигната при 19 от децата (42.2%). При 27.8% (10 деца) е установен нормален кариотип, но аCGH разкрива наличието на субмикроскопски хромозомни аберации [Jehee *et al.* 2005; Jehee *et al.* 2008]. Това е сравнително висок процент на подобни находки, което доказва ролята им в патогенезата на синдромната краниосиностоза. Някои от значимите находки са: dup 5p15.1-p14.1; dup 14q12; dup Xq22.3; dup Xq22.2; del Xp11.23; dup 6q27; dup 15q13.2; dup 22q11.23; dup 12q11.23 [Jehee *et al.* 2005; Jehee *et al.* 2008]. Авторите установяват също така, че дупликациите са по-чести от делециите, което означава, че повишения генен дозаж е вероятна причина за възникване на синостоза на краниалните сутури.

7.3 Моногенни (синдромни) краниосиностози

До момента са описани повече от 180 моногенни малформативни синдрома асоциирани с краниосиностоза. В основата им стоят патогенни варианти в определени гени – 62 известни до момента [Zollino *et al.* 2017; O'Hara *et al.* 2019]. Унаследяват се по Менделеевите закони: над 90% автозомно-доминантно, останалите 10% автозомно-рецесивно и X-свързано. В значителен процент от случаите се касае за *de novo* варианти [Zollino *et al.* 2017; O'Hara *et al.* 2019]. В Таблица 2 са представени генетичните и клинични характеристики на най-честите моногенни краниостенози – наименование, отговорен ген, анатомичен субстрат, дисморфични стигми, тип унаследяване, честота и допълнителни малформации и дефекти.

Таблица 2: Моногенни краниосиностози – общи характеристики

Синдром	Ген	Краниосиностоза	Дисморфизъм	Унаследяване	Честота	Други
Apert	<i>FGFR2</i>	Коронарна	Проптоза, среднолицева ретракция, синдактилия, дефекти на съзъбието	АД, но над 95% от случаите са <i>de novo</i>	1:65 000	Варираща степен на психомоторно изоставане; увреждане на слуха
Pfeiffer тип I, II и III	<i>FGFR2</i> , <i>FGFR1</i>	Комплексна, „детелиновиден череп“	Тежки проптоза и среднолицева ретракция; широки и медиално девиирани палци на горни и долни крайници	АД	1:100 000 новороден и деца	Психомоторното развитие варира от нормално до тежко изоставащо. При по-тежките форми са възможни зрителни, слухови и дихателни увреждания.
Crouzon	<i>FGFR2</i>	Коронарна, комплексна	Изразена проптоза, дивергентен страбизъм среднолицева ретракция, мандибуларен прогнатизъм, лицева асиметрия	АД	1-2:100 000 новороден и деца	Chiari I малформация, прогресивна хидроцефалия, загуба на слуха в 75% от случаите. Средно до тежко нервно-психично изоставане.

Muenke	<i>FGFR3</i>	Едно- или двустранна коронарна	Среднолицева ретракция, хипертелоризъм, лицева асиметрия	АД	1:30 000 новороден и деца	В 5% от случаите липсва синостоза, дори може да се наблюдава макроцефалия. НП развитие варира от нормално до леко забавено
Jackson-Weiss	<i>FGFR2</i>	Комплексна (мултисутурална)	Хипертелоризъм, лицева асиметрия,	АД	Не уточнена (много рядко състояние)	Глухота в 67% от случаите; интелекта обикновено е запазен
Beare-Stevenson cutis gyrata	<i>FGFR2</i>	Комплексна (мултисутурална)	Проптоза, среднолицева ретракция, палатосхиза, диспластични ушни миди	АД, но над 98% от случаите са <i>de novo</i>	Не уточнена (много рядко състояние)	Тежко психо-моторно изоставане, <i>cutis gyrata</i>
Bent bone dysplasia	<i>FGFR2</i>	Комплексна (мултисутурална)	Хетерогенен лицев дисморфизъм, <i>dentes prelaetales</i>	Единичните описани случаи са възникнали <i>de novo</i>	Не уточнена (много рядко състояние)	Огънати дълги кости на крайниците, остеопения, хипоплазия на пубисните кости и клавикулите
Saethre-Chotzen	<i>TWIST1</i>	Едно- или двустранна коронарна	Лицева асиметрия, максиларна хипоплазия, птоза, диспластични ушни миди	АД	1:50 000 новороден и деца	Брахидактилия, петопръстна клинодактилия, ниска линия на окосмяване
Краниофронтоназална дисплазия	<i>EFNB1</i>	Коронарна	Лицева асиметрия, ниска тилна линия на окосмяване, <i>widow's peak</i> , хипертелоризъм, широк и надлъжно разделен връх на носа	Х-свързано	Не уточнена (много рядко състояние)	Надлъжни линии на ноктите (особено на палците)
Carpenter	<i>RAB23, MEGF8</i>	Сагитална, ламбдовида и коронарна	Среднолицева ретракция, вдлъбнат нос, епикант	АР	Не уточнена (много рядко състояние)	Брахидактилия, синдактилия, аплазия/хипоплазия на средните фаланги
Antley-Bixler	<i>POR</i>	Брахицефалия, турицефалия	Среднолицева ретракция	АР	1:1 000 000 новороден и деца	Арахнодактилия, клинодактилия, камптодактилия
Boston type	<i>MSX2</i>	Коронарна	Лицева асиметрия и ретракция	АД	1:1 000 000	По-къса първа метатарзална кост на долни крайници

					новороден и деца	
Bohring-Opitz	<i>AXL1</i>	Метопична	Лицев дисморфизъм, фронтален nevus flammeus,	АД	Не уточнена (много рядко състояние)	Улнарна девиация и флексия на китките и метакарпофалангеланите стави. Тежък интелектуален дефицит.
Липсва официално наименование на дефекта	<i>CDC45</i>	Коронарна	Кранио-фациален дисморфизъм	АР	Не уточнена (много рядко състояние)	Тънки вежди, микротия, нисък ръст
ЗМС синдром 2	<i>COLLE C11</i>	Метопична	Кранио-фациален дисморфизъм	АР	Не уточнена (много рядко състояние)	Хипертелоризъм, блефароптоза, арковидни вежди, цепки на устните и небцето, глухота, радио-улнарна синостоза, генитални и везико-ренални аномалии
ERF свързана краниосиностоза	<i>ERF</i>	Комплексна (мултисутурална)	Проптоза, среднолицева ретракция	АД	1.1:1 000 новороден и деца	Chiari тип 1 малформация
Филаделфийска краниосиностоза	<i>INH</i>	Сагитална	-	АД	Не уточнена (много рядко състояние)	Кожна и костна синдактилия
Краниосиностоза и дентални аномалии	<i>IL11RA</i>	Комплексна (мултисутурална)	Кранио-фациален дисморфизъм	АР	Не уточнена (много рядко състояние)	Максиларна хипоплазия, забавена дентиция, свръхбройни зъби, минимални аномалии на пръстите, проводна загуба на слух.
Shprintzen-Goldberg	<i>SKI</i>	Сагитална, (мултисутурална)	Кранио-фациален дисморфизъм	АД	Не уточнена (много рядко състояние)	Хипертелоризъм, микрогнатия, високо небце, арахнодактилия, ставни контрактури, деформации на гръдния кош, аневризма на аортния корен, пролапс на митралната клапа, интелектуален дефицит
TCF12 свързана краниосиностоза	<i>TCF12</i>	Коронарна	Подобен на Saethre-Chotzen (влиза в ДД)	АД	1.3:1 000 новороден и деца	Неспецифични дисморфични стигми
Краниоектодермална дисплазия тип 2	<i>WDR35</i>	Сагитална	Кранио-фациален дисморфизъм	АР	Не уточнена (много	Тесен гръден кош, брахидактилия, рядка коса, хипопластични зъби, ренална

					рядко състояние)	поликистоза, чернодробна фиброза.
--	--	--	--	--	---------------------	--------------------------------------

Както е видно от Таблица 2, моногенните краниосиностози са голяма група заболявания. Част от дисморфичните им стигми се припокриват, което значително затруднява диференциалната диагноза. Поради моногенната им етиология, диагностичния подход се състои в специфични NGS панели, в които са включени познатите отговорни гени.

Синдром на Apert

Описан за първи път от френския лекар Eugene Apert при група пациенти със идентични краниални деформации и аномалии на пръстите през 1906-та година. Синдромът се причинява от патогенни, активиращи варианти в гена *FGFR2*, намиращ се на дългото рамо на 10-хромозома [Conrady *et al.* 2022; Kunwar *et al.* 2017]. Унаследява се по автозомно-доминантен механизъм. В повечето случаи (над 95%) се касае за *de novo* варианти. Приблизителната честота (варира според различни автори) е около 1:65 000 до 1:200 000 новородени деца. Не са установени полови предилекции [Conrady *et al.* 2022]. Установено е, че честотата на синдрома значително се увеличава с напредването на бащината възраст (поради изменения в спермогониите). Характерна е пълна пенетрантност, но силно вариабилна експресивност, което води до голяма амплитуда в тежестта на основните прояви на заболяването [Kunwar *et al.* 2017].

Характерните фенотипни белези са: коронарна краниосиностоза (едно- или двустранна), симетрична синдактилия (на долни и горни крайници) и лицев дисморфизъм. Последният се състои от: проптоза, среднолицева ретракция, хипертелоризъм, дефекти на съзъбието [Lam *et al.* 2006; Esser *et al.* 2005]. Допълнително могат да се наблюдават: варираща степен на психо-моторно изоставане, увреждане на слуха, зрителни увреждания и други [Athanasiadis *et al.* 2006; de Ângelis Ramos *et al.* 2019]. Прогнозата при тези деца зависи от тежестта на кранио-фациалните деформации и нуждата от оперативна корекция (Фигура 15)

[Crombag *et al.* 2014; Hopper *et al.* 2012; Khonsari *et al.* 2016; Marucci *et al.* 2008; Spruijt *et al.* 2016; Tovetjarn *et al.* 2012]. Обособени са определени репери (ехографски, биохимични и др.) за пренатална диагностика за синдрома на Apert, които са обект на екстензивни проучвания [Chen *et al.* 2010; Stark *et al.* 2015; Faro *et al.* 2006; David *et al.* 2007; Giancotti *et al.* 2014; Quintero-Rivera 2006; Mahieu-Caputo *et al.* 2001].



Фигура 15: Характерен лицево-черепен дисморфизъм при синдрома на Apert [Conrady *et al.* 2022].

Синдром на Pfeiffer тип I, II и III

Синдромът на Pfeiffer е рядко (1:100 000 новородени деца) състояние, което се характеризира с първична краниосиностоза, среднолицева хипоплазия, широки палци на ръцете (и краката) и мекотъканна синдактилия (Фигура 16) [Das *et al.* 2022]. I-ви тип се причинява от дефекти в гените *FGFR1* и *FGFR2*. Тип II и III се причиняват от патогенни варианти в *FGFR2* [Rai *et al.* 2022; Glaser *et al.* 2000]. Краниосиностозата при синдрома на Pfeiffer е комплексна (едновременна осификация на два или повече от черепно-мозъчните шевове), което води до различни краниални деформации (в някои случаи конфигурацията на черепа се

определя като „детелиновидна“) [Medina *et al.* 2009]. Психо-моторното развитие варира от нормално до тежко изоставащо. Могат да се наблюдават и комбинации от зрителни, слухови и дихателни увреждания. Състоянието се унаследява по автозомно-доминантен механизъм. Терапевтичните опции са предимно неврохирургични (декомпресионни и козметични) [Greig *et al.* 2022; Khonsari *et al.* 2016; Spruijt *et al.* 2016]. Пренаталната диагностика (образна, генетична) се проучва интензивно от множество колективи - [Itoh *et al.* 2006; Nazzaro *et al.* 2004; Chen *et al.* 2013; Ben Hamouda *et al.* 2012; Nieuwenhuizen-De Boer *et al.* 2014].

Синдромът е описан през 1964 година от Rudolf A. Pfeiffer, който съобщава за 8 пациента от едно семейство (от три поколения) със сходен краниофациален дисморфизъм и нервно-психично изоставане [Pfeiffer, 1964].



Фигура 16: Типичен лицев и черепен дисморфизъм при синдром на Pfeiffer [Das *et al.* 2022]

Синдром на Crouzon

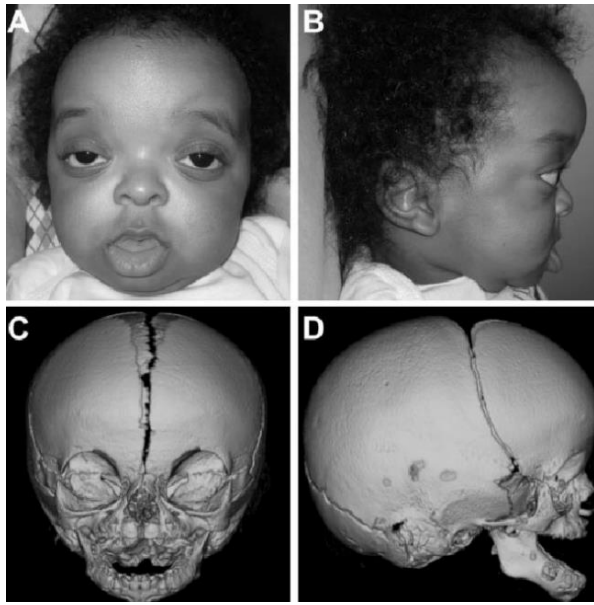
Генетично детерминирано състояние, характеризиращо се с краниосиностоза и резултатен тежък лицево-черепен дисморфизъм [Congrady *et al.* 2022]. Описано е за

първ път от френския лекар Octave Crouzon, който представя случай на майка и дъщеря с идентични дисморфични стигми, краниосиностоза и изразена проптоза. Той е нарекъл състоянието „краниофациална дизостоза“, което по-късно е променено на синдром на Crouzon в негова чест.

Честотата на това състояние е приблизително 1-2 на 100 000 новородени деца [Conrady *et al.* 2022]. Причинява се от определени патогенни варианти в *FGFR2* и *FGFR3*, които се намират на дългото рамо на 10-та хромозома. Синдромът има пълна пенетрантност, но вариабилна експресивност, което води до големи различия в тежестта на манифестираната клинична картина (дори между членове на едно семейство). Около 50% от случаите възникват *de novo*, останалите се предават по автозомно-доминантен път [Nørgaard *et al.* 2012].

Най-често наблюдаваните дисморфични стигми (Фигура 17) са: изразена проптоза, дивергентен страбизъм, среднолицева ретракция, мандибуларен прогнатизъм, максиларна хипоплазия, лицева асиметрия, хипертелоризъм, брахицефалия [Arnaud-Lopez *et al.* 2007; Di Rocco *et al.* 2011]. Допълнително могат да се наблюдават: цепки на устните и небцето, дентални деформации, Chiari I малформация, прогресивна хидроцефалия и загуба на слуха в 75% от случаите. Характерно за синдрома на Crouzon е средно до тежко нервно-психично изоставане. Типичната краниосиностоза е коронарна или комплексна. За разлика от синдрома на Pfeiffer и на Apert, при синдрома на Crouzon няма засягане на пръстите. При случаи с тежък дисморфизъм и повишено вътречерепно налягане се препоръчва оперативна корекция [Abu-Sittah *et al.* 2016; Khonsari *et al.* 2016; Raposo-Amaral *et al.* 2014; Spruijt *et al.* 2016].

Фигура 17. Краниофациален дисморфизъм и кореспондиращи находки от КАТ с 3D реконструкция при синдрома на Crouzon [Arnaud-Lopez *et al.* 2007].



Синдром на Muenke

Синдромът на Muenke се причинява от специфичен патогенен вариант в *FGFR3* гена – с.749C>G, който води до промяна в кодиращия протеин – p.Pro250Arg [Doherty *et al.* 2007]. Описан е от Maximilian Muenke и се среща при 1 на 30 000 новородени деца. Унаследява се по автозомно-доминантен механизъм, но в повечето случаи възниква *de novo* [Agochukwu *et al.* 2012].

Основната фенотипна проява на синдрома е едно- или по-често двустранна коронарна краниосиностоза. По-рядко се среща пансиностоза (едновременно вкостяване на 3 или повече черепно-мозъчни сuture), а в 5% от случаите синостозата липсва (дори може да се наблюдава макроцефалия). Резултатната конфигурация на главата варира от брахи- през турицефална до „детелиновидна“ в по-тежките случаи. Характерните дисморфични стигми са: хипертелоризъм, лека птоза и проптоза, лицева асиметрия, лека среднолицева ретракция, страбизъм и високо небце (Фигура 18) [Kruszka *et al.* 2016]. Допълнително могат да се наблюдават: загуба на слуха (33% от децата), нервно-психично изоставане – 31% от засегнатите (обикновено в лека степен), епилепсия, интракраниални аномалии,

синостоза на тарзалните и карпалните кости, брахи- и клинодактилия [Agochukwu *et al.* 2012].

Резултатите от ранна неврохирургична интервенция са отлични, когато това се случи преди края на 2-та година на детето. Това подчертава важноста на своевременната (включително пренатална) диагностика при децата със съмнение за моногенна краниосиностоза [Shaw *et al.* 2011].



Фигура 18. Типичен кранио-фациален дисморфизъм при синдром на Muenke [Doherty *et al.* 2007].

Краниофронтно-назална дисплазия

Изключително рядко състояние (няма изчислена официална честота), което за разлика от повечето моногенни синостози, се предава по X-свързан механизъм. Поради това, значително по-често се проявява при мъжкия пол. Причинява се от патогенни варианти в гена *EFNB1* [van den Elzen *et al.* 2014; Twigg *et al.* 2004]. В по-голямата част от описаните случаи възниква *de novo*, но могат да се наблюдават и фамилни форми на синдрома [Twigg *et al.* 2004].

Характерната краниална деформация е брахицефалия, дължаща се на бикоронарна краниосиностоза. Дисморфичните стигми, насочващи към диагнозата

са: лицева асиметрия, ниска тилна линия на окосмяване, фронтално окосмяване тип „widow’s peak“, тежък хипертелоризъм, широк и надлъжно разделен връх на носа (Фигура 19). Много характерни са и надлъжни цепки на ноктите, най-често на палците на ръцете [Twigg *et al.* 2004]. Нервно-психичното развитие варира от нормално до средно-тежко забавено. При данни за повишен вътречерепен натиск се прибегва до декомпресиращи неврохирургични операции [Kawamoto *et al.* 2007], а при по-леките случаи се предприемат оперативни намеси с козметични цели.



Фигура 19. Типичен кранио-фациален дисморфизъм и КАТ находка при Краниофронтно-назална дисплазия [Kawamoto *et al.* 2007].

Синдром на Jackson-Weiss

Много рядко състояние, което се характеризира с мултисутурална (комплексна) краниосиностаза, тежък хипертелоризъм и изразена лицева асиметрия. Причинява се от определени патогенни варианти в *FGFR2* гена [Celie *et al.* 2019]. Типични са аномалиите на пръстите на долни крайници – палеца е по-къс и често е девиран

латерално, рядко се наблюдава и костна синдактилия. Горните крайници обикновено остават незасегнати (Фигура 20) [Celie *et al.* 2019].

Предава се по автозомно-доминантен механизъм, но в повечето случаи се касае за *de novo* варианти. Няма уточнена официална честота. Двата пола са еднакво често засегнати. Характерна за синдрома на Jackson-Weiss е загуба на слуха до пълна глухота в приблизително 67% от случаите. Интелектът е запазен, което е много необичайно за групата на моногенните краниосиностози. Продължителността на живота е еднаква с тази в общата популация [Celie *et al.* 2019].



Фигура 20. Типичен кранио-фациален дисморфизъм и рентгенови находки при синдрома на Jackson-Weiss [Celie *et al.* 2019].

Синдром на Beare-Stevenson cutis gyrata

Синдромът на Beare-Stevenson cutis gyrata е рядко, генетично детерминирано състояние, което се характеризира с комплексна краниосиностоза, лицев дисморфизъм и типично кожно засягане (Фигура 21). Причинява се от патогенни варианти в *FGFR2* гена [Hall *et al.* 1992]. Дисморфизмът често включва: проптоза, среднолицева ретракция, палатосхиза, максиларна хипоплазия и

диспластични ушни миди. *Cutis gyrata* е типичната кожна манифестация на синдрома: участъци (с неправилна форма и разнообразни размери) от хиперпигментирана, суха и набръчкана кожа [Eun *et al.* 1992]. Може да се наблюдават навсякъде по кожата, но най-често засяга главата, гениталиите и крайниците. Обикновено се установява и тежко психо-моторно изоставане.

Синдромът се предава по автозомно-доминантен механизъм, но в над 98 % от случаите, възниква *de novo*. Официална честота не се съобщава (много рядко състояние) [Hall *et al.* 1992].

Терапевтичните опции са предимно хирургични – декомпресионни неврохирургични намеси и козметични дерматологични процедури.



Фигура 21. Типичен дисморфизъм и кожно засягане при синдрома на Веаге-Stevenson *cutis gyrata* [McGaughran *et al.* 2006].

„Bent bone“ дисплазия

Изключително рядко заболяване (в литературата са описани единични случаи) [Merrill *et al.* 2012], дължащо се на патогенни варианти в в *FGFR2* гена. Характерна е мултисутурална краниосиностоза, хетерогенен лицев дисморфизъм и огънати кости („bent bones”) на дългите крайници (Фигура 22). Типичната слаба минерализация води до остеопения и хипоплазия на клавикулите и пубисните кости. Може да се наблюдава и хипоплазия на челюстите с псевдо-прелактални зъби (*pseudo- dentes prelactales*) [Merrill *et al.* 2012]. Наблюдават се и тежки

отклонения в плазмените нива на калций и фосфор. Състоянието е много тежко и води до летален изход още в перипарталния период. Обект е на реанимационни и поддържащи мерки.



Фигура 22. Дисморфизъм и костни промени при „Bent bone“ дисплазия [Merrill *et al.* 2012].

Синдром на Saethre-Chotzen

Синдромът на Saethre-Chotzen се дължи на патогенни варианти в гена *TWIST1*, който се намира на 7-ма хромозома [Cunningham *et al.* 2012; Galbiati *et al.* 2014]. Характерният фениотип включва: едно- или двустранна коронарна краниосиностоза, лицева асиметрия, хипертелоризъм, аномалии на твърдото небце, максиларна хипоплазия, птоза, малки и диспластични ушни миди, кожна синдактилия на втори и трети пръст на ръцете (Фигура 23) [Massalska *et al.* 2014]. Допълнително могат да се наблюдават: брахидактилия, петопръстна

клинодактилия, радио-улнарна синостоза, ниска фронтална линия на окосмяване [Cai *et al.* 2003]. По-рядко синдромът се асоциира с обструктивна сънна апнея, нисък ръст и вродени сърдечни аномалии [de Heer *et al.* 2005].

Синдрома на Saethre-Chotzen се унаследява по автозомно-доминантен механизъм, но повечето случаи възникват *de novo*. Честотата на синдрома е около 1 на 50 000 новородени деца. Нервно-психичното развитие обичайно е нормално [de Heer *et al.* 2005]. Съществуват методи за пренатална диагностика [Spaggiari *et al.* 2012; Gebb *et al.* 2012]. Терапевтичният подход е неврохирургичен.



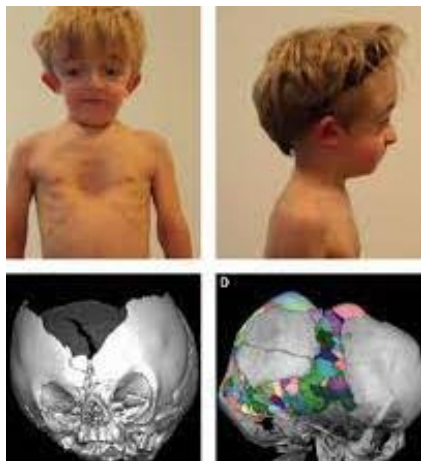
Фигура 23. Характерен краниофациален дисморфизъм при синдрома на Saethre-Chotzen [Massalska *et al.* 2014].

Синдром на Carpenter

Синдромът на Carpenter се дължи на патогенни варианти в гените *RAB23* и *MEGF8*. Честотата е неизвестна – в литературата са описани единични случаи [Alessandri *et al.* 2014]. За разлика от повечето моногенни краниосиностозаи, синдрома на Carpenter се предава по автозомно-рецесивен механизъм. Характерният фенотип се състои от: сагитална, ламбдовидна или коронарна краниосиностоза,

среднолицева ретракция, вдлъбната основа на носа, медиален епикант, брахидактилия, синдактилия и хипо-аплазия на средните фаланги на пръстите (Фигура 24) [Hidestrand *et al.* 2014]. Допълнително могат да се наблюдават: антимоногоидни очни цепки и челюстна хипоплазия [Perlyn *et al.* 2008]. Децата със синдром на Carpenter страдат още от: нервно-психично изоставане, зрителни нарушения, слухови нарушения, умбиликална херния и вродени сърдечни малформации (декstroкардия, транспозиция на големите съдове).

При повечето доказани случаи на синдром на Carpenter се препоръчва оперативна корекция на краниосиностозата. Най-добри резултати се постигат ако това се случи до 9-месечна възраст. При засегнатите семейства е възможна МГК [Haue *et al.* 2014]



Фигура 24. Характерен краниофациален дисморфизъм и кореспондиращите КАТ находки при синдрома на Carpenter [Hidestrand *et al.* 2014].

Синдром на Antley-Bixler

Тежко протичащо състояние, което се манифестира веднага след раждането (в някои случаи е видимо и на пренатална ехография [Oldani *et al.* 2015]) с тежки,

животозастрашаващи малформации [Gorlin *et al.* 2013]. Сред по-често срещаните са: тежка коронарна или ламбодвидна краниосиностоза с брахицефалия или турицефалия, среднолицева ретракция, арахнодактилия, клинодактилия, камптодактилия, деформирани дълги кости (улна, радиус, фемур), ренални и вродени сърдечни малформации (Фигура 25) [Gorlin *et al.* 2013]. При момичета може да се наблюдава и вагинална атрезия. Посочените прояви обикновено са тежки и са налице още в перипарталния период, поради което децата имат нужда от интензивни грижи в неонатологична клиника. Преживяемостта е ниска, повечето деца не оцеляват до необходимите хирургични и неврохирургични интервенции.

Синдромът на Antley-Vixler се причинява от патогенни варианти в гена *POR*, който се намира на дългото рамо на 7-ма хромозома [Gorlin *et al.* 2013]. Унаследяването е автосомно-рецесивно. Приблизителната честота на синдрома е 1 на 1 000 000 новородени деца.



Фигура 25. Новородено дете със синдром на Antley-Vixler - характерен краниофациален дисморфизъм (A) и (B), рентгенови находки („огънати дълги кости“) (C) и компютърно-томографска реконструкция на черепа (D) [Gorlin *et al.* 2013].

7.4 Други синдроми асоциирани с краниосиностоза

Синдром на Sotos

Синдромът на Sotos е рядко, но добре познато, автозомно-доминантно състояние, което е една от причините за свръхрастеж в детска възраст. Характеризира се още с: макроцефалия, изпреварваща костна възраст, сърдечно-съдови, скелетни, ЦНС и други аномалии. Децата със синдрома на Sotos проявяват различна степен на психо-моторно изоставане [Douglas *et al.* 2003]. Интрагенни мутации в *NSD1* (Nuclear receptor Set Domain containing protein 1) причиняват около 90% от случаите, а останалите 10% се дължат на микроделеции в дългото рамо на 5-та хромозома (del 5q35) [Nie *et al.* 2006]. Съществуват значителни географски и расови предилекции по отношение на етиологичния механизъм, причиняващ синдрома. Авджиева и сътрудници, съобщават случай на едногодишно момче, реферирано в Клинична генетика за диагностично уточняване поради нервно-психично изоставане. При детето са установени още: макродолихоцефалия, проминиращи фронтални тубери, издължено лице, хипертелоризъм, мускулна хипотония, умбиликална херния и двустранни трансверзални бразди на дланите (Фигура 26). Поради видимата черепна деформация е проведена фасова и профилна краниография, която показва сагитална краниосиностоза. Генетичното уточняване показва наличието на микроделеция 5q35 с размер 1.665 Mb (175,470,501-177,136,261) обхващаща 40 HGNC и 24 OMIM гени, включително *NSD1* и *FGFR4*. Асоциацията на краниосиностоза и синдром на Sotos е много рядка находка. Douglas и сътрудници описват микроделеционен вариант на Sotos (отново обхващаща гените *NSD1* и *FGFR4*), асоцииран с краниосиностоза. Предполага се връзка на делетираните гени с развитието на скелетните аномалии при синдрома, сред които е възможно да се наблюдава и краниосиностоза.



Фигура 26. Характерен дисморфизъм при синдрома на Sotos [Архив на Клинична генетика, 2016].

Холопрозенцефалия и краниосиностоза

Холопрозенцефалия и краниосиностоза (синдром на Camero-Lituania-Cohen) – асоциацията между холопрозенцефалия и ендогенна краниосиностоза (коронарна и метопична) е рядка находка. Касая се за генетичен дефект, провокиращ аномалии в ембриогенезата на краниалните структури. Наблюдават се още: скелетни аномалии (петопръстна клинодактилия, сколиоза, хипоплазия на дисталните фаланги), лицева асиметрия, микроцефалия, нисък ръст и психомоторно изоставане [Camera *et al.* 1993].

Синдром на Nijmegen Breakage

Nijmegen Breakage синдромът [Seemanova *et al.* 2019] е автозомно-рецесивно състояние, причинено от патогенни варианти в *NBS* гена. Синдромът се характеризира с: прогресираща конгенитална микроцефалия, дисморфични стигми (Фигура 27), изоставане в растежа, имуен дефицит и predisпозиция към онкологични заболявания. Основна проява на синдрома е т.нар. хромозомна

„чупливост“ (или нестабилност) – тенденция за множество, несистемни хромозомни аберации под влиянието на различни фактори. Най-честия провокиращ фактор е йонизиращата радиация (рентген, слънчева светлина). Краниосиностозата е сравнително рядка находка и не се счита за част от типичните прояви на NBS. Seemanova *и сътрудници* описват случай на хетерозиготни близнаци, при които е забелязана интраутеринна микроцефалия и абнормна форма на черепите в 31-ва гестационна седмица. След раждането се установява наличието на дисморфични стигми и комплексна краниосиностоza (коронарна и сагитална) у двете деца, но изразени в различна степен. Поради наличието на вродена микроцефалия е проведен скрининг за Nijmegen Breakage (стандартна практика в Чехия и Словакия, поради по-високата честота на синдрома в тези популации). Най-честата мутация 657del5 се установява при сиблингите, което доказва диагнозата. Краниосиностозата при първия близък е по-силно изразена, което я прави обект на неврохирургична корекция [Seemanova *et al.* 2019]. Корелацията между Nijmegen Breakage и краниостенозата остава неясна и изисква допълнителни изследвания.



Фигура 27. Характерен дисморфизъм при синдрома на Nijmegen Breakage [Seemanova *et al.* 2019].

RAS-опати

RAS-опатиите са група заболявания причинявани от мутации в определени гени, които кодират протеините на т.нар. RAS/MAPK сигнален път. Част от фенотипните прояви на тези синдроми се припокриват. Към тях се включват: неврофиброматоза тип 1, синдром на Legius, синдром на Noonan, Noonan-like синдром, LEOPARD – синдром, синдром на Costello и Кардиофациокутанен синдром (CFC) (Фигура 28) [Zollino *et al.* 2017]. Синдромът на Noonan се характеризира с нисък ръст, характерен лицев дисморфизъм (хипертелоризъм, насочени надолу ъгли на очните цепки, птоза и ниско поставени ушни миди), къс врат с птериgium, вродени сърдечни малформации (стеноза на пулмоналната клапа, хипертрофична кардиомиопатия), хеморагична диатеза, миелопролиферативни състояния и лек до умерен когнитивен дефицит. Кардиофациокутанният синдром се характеризира с невиреене, дистинктивен лицев дисморфизъм с високо чело и битемпорално стеснение, ектодермални аномалии (палмоплантарна кератоза), вродени сърдечни малформации и тежко психомоторно изоставане. Синдрома се причинява от патогенни варианти в следните гени: *BRAF*, *MAP2K1* и *KRAS*. Сред представителите на RAS-опатиите, краниосиностозата се среща само при синдрома на Noonan и кардиофациокутанния синдром и то изключително при варианти причинени от мутации в следните гени: *PTPN11*, *SHOC2*, *KRAS* и *BRAF*. Краниосиностозата се среща при 9 % [Zollino *et al.* 2017] и при 33 % [Addissie *et al.* 2015] от пациентите съответно с Noonan и CFC. Тези значителни генотип-фенотипни корелации вероятно се дължат на специфични механизми на етиопатогенеза на краниостенозата, които изискват допълнителни изследвания.



Фигура 28. Лицев дисморфизъм при различните синдроми в рамките на RAS-опатиите [Zollino *et al.* 2017].

Синдром на Kabuki make-up

Kabuki make-up синдромът е рядко, моногенно състояние, което се манифестира клинично със специфичен лицев дисморфизъм (Kabuki make-up) – дълговидно извити вежди, дълги мигли и евертирани долни клепачи (Фигура 29) [Martínez-Lage *et al.* 2017]. Допълнително могат да се наблюдават: различна степен на интелектуален дефицит, нисък ръст, скелетни аномалии и вродени сърдечни малформации. Синдромът се причинява от мутации в *KMT2D* и *KDM6A* гените [Тора *et al.* 2017]. Краниосиностоза се среща при около 6% от пациентите със синдром на Kabuki [Martínez-Lage *et al.* 2017]. Причините за тази асоциация са неясни и са обект на екстензивни проучвания.



Фигура 29. Характерен дисморфизъм при синдрома на Kabuki make-up [Martínez-Lage *et al.* 2017].

Краниосиностоза може да бъде част от клиничната картина на още много синдроми: Koolen De-Vries, Ohdo, Mowat-Wilson и др. Това многообразие от възможни асоциации доказва огромната клинична и генетична хетерогенност на краниосиностозата и значително усложнява диагностичния процес.

7.5 Метаболитни болести и краниосиностоза

Мукополизахаридоза (МПЗ)

Мукополизахаридозите (МПЗ) са метаболитни болести, които се причиняват от генетично обусловен частичен или тотален дефицит на определени лизозомни ензими. В резултат на ензимния дефект се натрупват глюкозаминогликани (ГаГ) в различни тъкани и органи. МПС са мултисистемни заболявания, които се проявяват

с широк спектър от симптоми, включително скелетни аномалии (*dysostosis multiplex*, ставни контрактури) и краниостеноза (Фигура 30) [Oussoren *et al.* 2018]. Нервно-психичното изоставане при тези пациенти се обяснява частично с натрупване на ГаГ в ЦНС при невропатичните форми, но и с влиянието на повишено вътречерепно налягане при наличие на краниосиностоза. Oussoren и сътрудници са провели мащабно проспективно проучване (завършило през 2017-та година) на 47 пациента с МПЗ тип I, II, VI и VII. Диагнозата е доказана чрез измерване на ензимната активност в левкоцити или фибробласти, а след това потвърдена чрез ДНК анализ. Пациентите са проследявани ежегодно в продължение на 10 години. Синостоза на поне един от черепно-мозъчните шевове е доказана (чрез рентгенографски и компютърно-томографски методи) в 77 % от децата в изследваната група. При 40 % от изследваните, краниосиностозата е настъпила преди навършването на 6 годишна възраст. В 66 % от пациентите е установена синостоза на 2 или 3 от черепните сутури (пансиностоза). При 26 % от пациентите с МПЗ се установява скафоцефалия, в 51% - нормоцефалия, а плагицефалия и тригоноцефалия са наблюдавани значително по-рядко. При част от пациентите е наблюдавана комбинацията от вътрешна хидроцефалия и краниосиностоза, което е довело до ранно и значително повишение на вътречерепното налягане [Oussoren *et al.* 2018]. Това е провокирало пароксизмални прояви и количествени промени в съзнанието, поради което е проведена отбременяваща неврохирургична интервенция в спешен порядък. Авторите не установяват нито преобладаващ вид краниална деформация, нито специфични асоциации на определен тип МПЗ с определен вид синостоза. В заключение, Oussoren и сътрудници установяват голяма честота на краниосиностоза в смесена група от пациенти с мукополизахаридоза. Тази комбинация значително утежнява клиничната картина и влошава протичането и прогнозата на засегнатите деца. Генетичните причини за тази специфична асоциация на МПЗ с краниосиностоза остават неясни и налагат допълнителни изследвания. При установяване на тежка краниална деформация у дете с МПЗ е задължително да проведе образно изследване на черепа с оглед на опасността от възникване на краниосиностоза.



Фигура 30. Пациенти с мукополизахаридоза тип VI (Maroteaux-Lamy) – характерен лицев дисморфизъм и скелетни промени [Oussoren *et al.* 2018].

Хипофосфатазия

Хипофосфатазията е рядко метаболитно заболяване, характеризиращо се с дефектна костна минерализация и вариабилна клинична експресия. Дължи се на мутации в *ALPL* гена, които водят до дефицит или липса на функция на ензима алкална фосфатаза [Di Rocco *et al.* 2017]. В зависимост от тежестта на ензимния дефект, засегнатите деца имат различни по тежест клинични прояви (костни и други). Перинаталната форма на хипофосфатазията е летална и се проявява с тежка хипотония, респираторен дистрес, гърчове и хипотрофия [Di Rocco *et al.* 2019]. Диагнозата се изгражда на базата на типично скелетно засягане, хиперкалциемия, хиперфосфатемия и ниска активност на алкалната фосфатаза [Di Rocco *et al.* 2017]. При инфантилната форма, симптомите се проявяват преди 6 месечна възраст и включват: невиреене, мускулна хипотония, чести респираторни инфекции, хиперкалциемия, аномалии на гръдния кош и прогресираща краниосиностоза. Типичните рентгенографски белези на хипофосфатазията са: чашковидни метафизи на дългите кости с разширени и проминиращи растежни пластини, както и глобална хипоминаерализация (Фигура 31) [Di Rocco *et al.* 2017]. При възрастни, заболяването се проявява с чести фрактури и дентални дефекти.

Около 2/3 от пациентите с инфантилна форма на хипофосфатазия са с краниосиностоза [Di Rocco *et al.* 2019]. Патофизиологията на преждевременната краниална осификация при хипофосфатазията е неясна. Когато диагнозата се постави рано, пациента се изследва и за краниосиностоза. Много по-редки са случаите, при които установяването на краниостеноза води до откриването и на хипофосфатазия на втори етап [Di Rocco *et al.* 2019].



Фигура 31. Типичен фенотип (A), дентални промени (B) и деформация на гръдния кош (C) при дете с Хипофосфатазия. В ляво – характерна находка от рентгенографии на крайниците [Di Rocco *et al.* 2017].

Скелетни дисплазии - Ахондроплазия

Въпреки че скелетните дисплазии и краниосиностозите са етиологично и патоанатомично различни състояния, фенотипните им прояви могат да се припокриват в различна степен. Това се наблюдава най-често при: танатофоричната, остеоглофоничната дисплазия и в много редки случаи при ахондроплазията (до момента са описани само 4 случая в световен мащаб [Bessenyei *et al.* 2013]. Ахондроплазията е сред най-честите причини за диспорпорционален нисък ръст с честота около 5-15 на 100 000 новородени деца.

Характеризира се с ризомиелично скъсяване на крайниците, макроцефалия с проминиращо чело, среднолицева хипоплазия и деформации на ръцете и пръстите (Фигура 32 - [Bessenyei *et al.* 2013]). Описаният фенотип е резултат от намалена ендохондрална осификация, причинена от активиращи (gain-of-function) мутации гена за рецептора за фибробластния растежен фактор 3 (*FGFR3*) [Bessenyei *et al.* 2013]. Ахондроплазията се унаследява по автозомно-доминантен механизъм, но в по-големия процент от случаите се касае за *de novo* мутации (най-често p.Gly380Arg – с.1138G>A или с.1138G>C). Bessenyei и сътрудници представят изключително рядко клиничен случай на асоциация между ахондроплазия (p.Gly380Arg в *FGFR3*) и краниосиностоза. Описват момиче, родено от втора бременност на некосангвинитетни родители. Фамилната история е необременена както за ахондроплазия, така и за краниосиностоза. Още по време на ехографското проследяване на бременност са установени фетални изменения, характерни за ахондроплазия. Физикалният преглед при детето показва типични скелетни промени, но впечатление прави макро-acro-плагицефалната конфигурация на главата с депресия на корена на носа и среднолицева хипоплазия. На 2-месечна възраст са проведени образни изследвания (КАТ с 3D реконструкция на черепа), които показват мултисутурална синостоза, засягаща метопичния, коронарния и левия клон на ламбдовидния шев. Поради значително увеличение на вътречерепното налягане е проведена серия от неврохирургични намеси (на 3, 8, 16 и 26-месечна възраст). На 5-месечна възраст е поставен и вентрикулоперитонеален шънт поради нарастваща хидроцефалия. Показателите на калциево-фосфорната обмяна и на нервно-психичното развитие са нормални. Таргетно секвениране на *FGFR3*, показва p.Gly380Arg (с.1138G>A), което верифицира диагнозата ахондроплазия. В опит да се открие генетична причина за придружаващата пансиностоза, са секвенирани *FGFR1*, *FGFR2* и *TWIST1* – не се откриват дефекти. Допълнително е проведено конвенциоално кариотипиране, MLPA за микроделеции и aCGH, които показват нормални резултати. Молекулярно-генетична причина за необичайната комбинация от ахондроплазия и краниосиностоза в този случай остава необяснена. Авторите предлагат като обяснение силно вариабилната експресивност на патогенния вариант в *FGFR3* от

една страна и влиянието на допълнителни епигенетични и механични фактори, от друга страна. Описаният пример доказва, че въпреки сравнително рядката асоциация с краниосиностоза, при пациенти със скелетна дисплазия, би трябвало да се провежда и образно изследване на глава.



Фигура 32. Ахондроплазия – характерен фенотип при новородено дете (А), при същото дете на 3 годишна възраст и типични рентгенографски находки на долни крайници - (С) [Bessenyei *et al.* 2013].

Асоциацията между краниосиностоза и рахит е известна [Rothenbuhler *et al.* 2018; Jaszczuk *et al.* 2016; Murthy *et al.* 2009; Currarino *et al.* 2007], но при всички описани случаи се касае за несиндромна краниосиностоза. Въпреки това изследването на калциево-фосфорната обмяна при всички пациенти с краниосиностоза е задължително.

8. Генетични тестове прилагани в съвременната диагностика на деца с краниосиностоза.

Генетичните тестове, които се прилагат за диагностично уточняване на деца с краниосиностоза са многобройни, поради етиологичната хетерогенност на тези черепни деформации. За да бъде пълноценна и максимално ефективна, генетичната верификация протича в йерархична последователност. Най-често диагностиката започва с конвенционална цитогенетика [Авджиева-Тзавелла, 2012] и продължава с микроделеционен (MLPA) и микрочипов анализ (aCGH) [Хаджидекова, 2011]. При специфични показания се прибегва до определени NGS панели, които скринират за патогенни варианти на отговорните за краниосиностоза гени. В случаи, при които чрез изброените методи не се постигне генетично уточняване, се налага да се използват допълнителни методи като: пълно екзомно секвениране (WES) и пълно геномно секвениране (WGS).

8.1 Конвенционално кариотипиране

Най-често използваният биологичен материал за кариотипиране е периферна кръв, взета в стерилни епруветки с хепарин, в обем не по-малко от 2 милигра. При конвенционалната цитогенетика, хромозомите се визуализират в клетъчен стадий на мета- или прометафаза [Авджиева-Тзавелла, 2012]. Повечето клетки са с нисък митоточен индекс и това налага предварително култивиране. Най-често използваният митоген за индукция на клетъчно делене е фитохемаглутинин (ФХА), който стимулира Т-лимфоцитите. Култивирането продължава около 72 часа в термостат с постоянна температура от 37 градуса по Целзий. За целите на кариотипирането са необходими метафазни хромозоми. Поради това преди края на култивирането се добавя колхицин, който блокира образуването на делителното вретено и хромозомите спират деленето си в стадий на метафаза [Авджиева-Тзавелла, 2012]. За да се наблюдават под микроскоп, получените метафазни пластинки се оцветяват с различни техники. Най-често използваната техника е G – лентуване, при която са определени три нива на хромозомна резолюция – 400, 550 и 850 ленти на хаплоиден набор. За анализ се подбират подходящи метафазни пластини с отчетливо лентуване на хромозомите. Анализът се провежда под

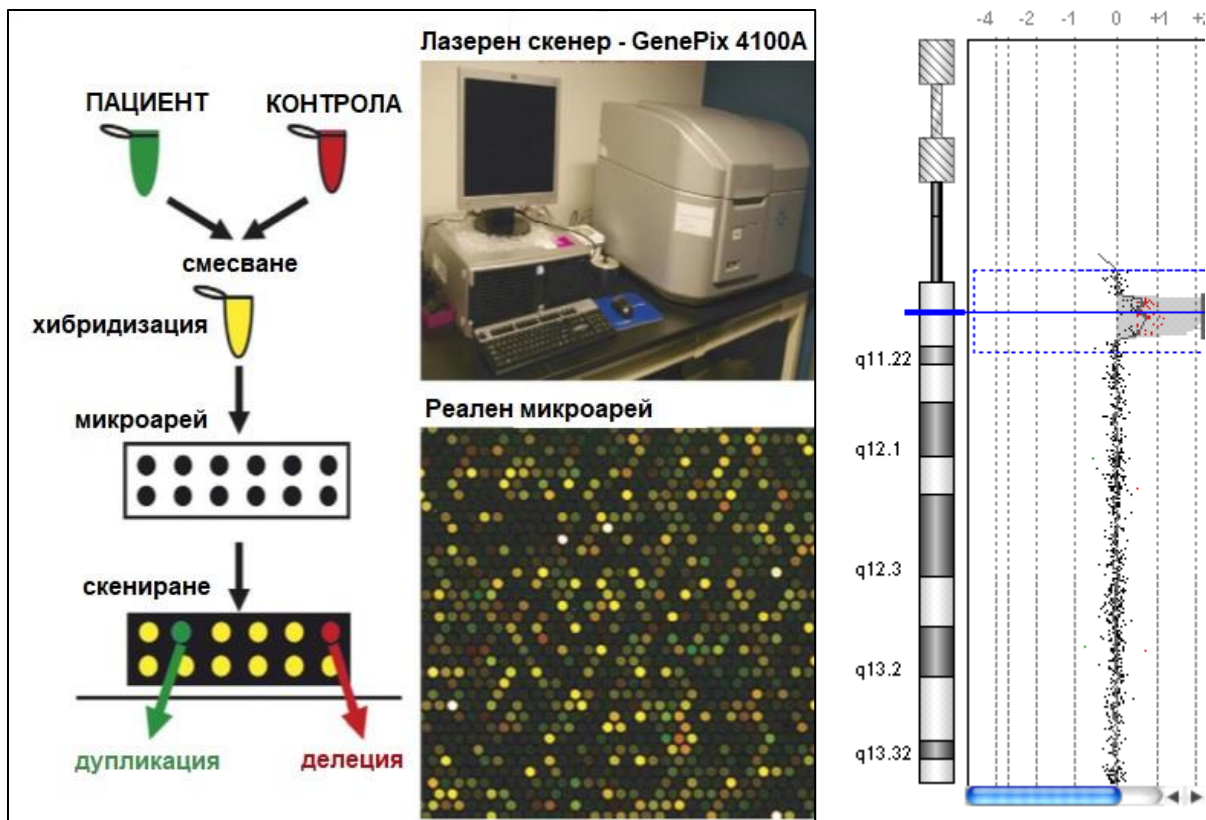
микроскоп като се документират най-малко 3 кариограмни записа при всеки пациент [Авджиева-Тзавелла, 2012]. Хромозомите се разпределят в кариотип по големина, по разположение на центромера и по характеристика на G – лентовия образ. Процеса завършва с изготвяне на цитогенетичен рапорт, който посочва кариотипа на изследвания пациент (чрез формула), което се придружава от допълнително разяснение при наличие на находки. Конвенционалната цитогенетика се използва предимно за диагностика на тежки хромозомни аберации, които могат да причинят краниосиностоза.

8.2 Мултиплексна лиганд зависима сондова амплификация (MLPA)

Мултиплексна лиганд зависима сондова амплификация (MLPA) е PCR-базиран тест, способен да детектира промени в броя на копията (copy number variations, CNV) на човешките гени, ДНК метилиране и точкови мутации. Използват се проби, които разпознават таргетни секвенции от 50 до 100 нуклеотида. Това дава възможност MLPA да се използва при анализ на силно фрагментирана ДНК и за детекция на малки делеции/дупликации в единичен екзон. Най-важно за анализа е генерирането на специфичните MLPA проби. Всяка проба разпознава дадена геномна секвенция и се състои от две части: ляв и десен олигонуклеотид. Всеки от тях съдържа PCR праймер и ДНК хибридизационна секвенция. MLPA реакцията протича в следните стъпки: 1-ДНК денатурация/хибридизация; 2-лигазна реакция; 3-PCR амплификация; 4-разделяне на фрагментите и 5-анализ на резултатите. Анализът на пробите се извършва с помощта на специализиран софтуер. Броят на копията се определя чрез сравнение на височината на пика за MLPA в анализирания материал и в референтен материал с известен нормален брой копия. MLPA се използва за детекция на субмикроскопски дефекти (по-малко от 5 милиона базови двойки) и намира широко приложение при деца с кранио-фациални дефекти.

8.3 Сравнителна геномна хибридизация (Array-based comparative genomic hybridization – aCGH)

Първоначално е използвана т. нар. конвенционална CGH за цитогенетичен анализ при солидни тумори, чиито клетки е трудно да бъдат култивирани. Референтна ДНК и ДНК от пациента се маркират с различни флуоресцентни багрила и се извършва хибридизация с нормални метафазни хромозоми. Загубата или излишъкът от генетичен материал в тествания индивид в сравнение с контролната проба се представя като съотношение, което количествено се определя чрез дигитален образен анализ. Този метод е много подходящ за определяне произхода на маркерни хромозоми или други небалансирани преустройства. Резолюцията на конвенционалната CGH обаче е 5-10 Мв и следователно много генетични преустройства остават неразкрити [Edelmann and Hirschhorn, 2009]. Нуждата да се скринира целият геном с резолюция, която превъзхожда тази на съществуващите технологии води до внедряване на сравнителната геномна хибридизация с микрочипове, чийто принцип е много подобен на конвенционалната CGH. Две различно маркирани проби ДНК (референтна и тествана) кохибридизират в присъствието на Cot1-ДНК с ДНК субстрат имобилизиран върху стъклени слайдове вместо с метафазни хромозоми [Cai *et al.*, 2003]. След това микрочиповете се сканират и резултатите се анализират от софтуер, който изчислява \log_2 съотношението в различния брой копия при пациента и контролата (виж Фиг. 33).



Фигура 33. Схематично представяне на array CGH [Авджиева-Тзавелла, 2012].

a) Маркираните с различни флуоресцентни багрила тестова и референтна ДНК копреципитират и хбридизират върху микрочиповете; **b)** и **c)** Слайдовете се анализират чрез скенер и се определя интензивността на флуоресценцията на всяка проба; **d)** След обработка на образите и нормализация на данните, \log_2 съотношението се начертава като функция на хромозомната позиция. При стойност на сондите „0” е налице еднаква флуоресцентна интензивност между тестваната и референтна ДНК. Всяка точка представлява отделна сонда разположена върху микрочиповете. Наличието на допълнителен или липсващ генетичен материал измества съотношението в ляво или дясно.

В момента се използват два основни вида микрочипове. Първоначално е въведена употребата на човешки изкуствени хромозоми (Bacterial Artificial

Chromosomes, BAC), а по-късно и на олигонуклеотиди, които позволяват по-плътно покриване на генома. Създаването на двата типа микрочипове става възможно благодарение на пълното картиране и секвениране на човешкия геном. BAC-микрочиповете могат да съдържат ДНК изолирана от големи inserтирани клонове с размер 150–200 Kb, разположена директно върху стъклените слайдове или PCR продукти амплифицирани от BAC-клонове [Ylstra *et al.*, 2006]. Най-общо тези микрочипове са много чувствителни и резултатите могат да бъдат директно валидирани чрез FISH, използвайки BAC-ДНК като сонди. Производството на BAC-ДНК обаче е трудоемко и резолюцията е ограничена до 50–100 Kb [Ishkanian *et al.*, 2004]. Олигонуклеотидите предлагат гъвкав формат с потенциал за много висока резолюция и промяна според нуждите на изследването. Налични са няколко различни платформи на микрочипове с олигонуклеотиди, някои са адаптирани от базирани на SNP олигонуклеотиди от целия геном, а други са създадени от библиотека от виртуални сонди, обхващащи целия геном и следователно могат да бъдат конструирани с екстремно висока резолюция [Shaikh, 2007]. BAC и олигонуклеотидите много успешно се прилагат за откриване на CNVs при пациенти с умствена недостатъчност/множество вродени аномалии и аутизъм. Няколко различни метода с промяна на дизайна на микрочиповете се използват за диагностични цели. Таргетните микрочипове съдържат сонди насочени към определен район на генома, напр. субтеломерите и се използват за диагностика на познати микроделеционни / микродупликационни синдроми [Shaffer, 2006]. Този метод първоначално е използван за постнатална диагноза, а по-късно и за пренатална при абнормна ултразвукова находка или за целите на скринингови програми [Kitsiou-Tzeli *et al.*, 2008]. Друг вид са микрочиповете покриващи целия геном, които се препокриват подобно на подреждането на керемиди (tiling path array), чиято резолюция зависи от подреждането на сондите. За нуждите на клиничната практика обикновено се използват микрочипове с резолюция 50 Kb -1 Mb, често с добавяне на допълнителни сонди в областта на субтеломерите [Toguner *et al.*, 2007]. По-пълното покриване на целия геном с този вид микрочипове води до идентифициране на допълнителни 5% от аномалиите в сравнение с таргетните микрочипове [Veltman, 2007; Baldwin *et al.*, 2008]. За научни цели са създадени

олигонуклеотиди с много висока плътност покриващи целия геном или регион-специфични (направени по поръчка за нуждите на изследването), които се използват при дефиниране на нови синдроми, откриване на делеции в таргетни гени и характеризиране на районите на нарушаване целостта на генетичния материал [Wong *et al.*, 2008].

Развитието на микрочипове, съставени от хиляди имобилизирани в субстрат сонди, позволява за пръв път да се направи високорезолютивен скрининг на целия геном. Това води до идентифициране на няколко стотин CNVs в човешкия геном. При най-новите прилагани методи, използващи клонирана ДНК (кДНК, cDNA), едноверижни продукти от полимеразна верижна реакция (PCR) и олигонуклеотиди, значително е увеличена резолюцията на геномните микрочипове [Brennan *et al.*, 2004; Dhami *et al.*, 2005]. В Табл. 3 са резюмирани съвременните методи да цялостно геномно CNV-скриниране.

МЕТОДИКА	ПРЕДИМСТВА	НЕДОСТАТЪЦИ
Array CGH-cDNA/BAC	Скрининг на целия геном	По-ниска резолюция
Array CGH-oligonucleotide	Висока плътност на дизайна	По-ниска специфичност на сондите
Array CGH- SNP	Може да определи родителския произход	Ограничено от наличието на SNPs (обикновено изключва сегментни дупликации); По-скъп метод
Широкообхватно геномно секвениране в две посоки за	Открива балансирани аномалии	Изисква секвенционни данни с висока плътност;

идентифициране на структурни вариации		По-големи инсерции не се откриват; Много скъп
Сравнителен (междувидов) секвенционен анализ	Открива балансирани аномалии	Изисква секвенционни данни; Възможни са грешки при сглобяването и напасването на данните

Таблица 3. Съвременни методи да цялостно геномно CNV-скриниране [Авджиева-Тзавелла, 2012].

Приложение на array CGH в клиничната генетика

Сравнителната геномна хибридизация с микрочипове е чувствителен, специфичен и бърз метод за откриване на небалансирани геномни изменения.

Array CGH е модерен метод за ДНК анализ, позволяващ изследването на човешкия геном с резолюция 5-10 пъти по-висока от тази на рутинния хромозомен анализ при кариотипиране [Rosenberg *et al.*, 2006]. Array CGH се използва много успешно при анализ на туморни клетки и при пациенти с умствена недостатъчност и вродени аномалии [Shaw-Smith *et al.*, 2004; Shoumans. *et al.*, Hadjidekova *et al.*, 2011]. Array CGH доведе до революция в цитогенетичната диагностика и съответно в обгрижването на пациенти в клиничната генетика [Shaffer 2007]. Този метод даде на клиницистите по-дълбоко разбиране на вариабилността в клиничната картина на много добре познати заболявания [Cytrynbaum *et al.*, 2005], бяха идентифицирани непознати преди хромозомни синдроми със сравнително леки фенотипни изменения и бяха прецизирани критичните райони на известни генетични заболявания [Vissers *et al.*, 2004]. Array CGH позволи да бъде оценена честотата на мозаицизма при индивиди с умствена недостатъчност и да се установи неочаквано висока честота на CNVs в генома [Shaffer, 2008]. Освен това приложението на array CGH доведе до изместване на парадигмата в генетиката от

подхода, при който първо се описва фенотипа и на пациентите със сходни клинични симптоми се поставя диагноза преди да е разкрита подлежащата етиология, към подхода при който първо се диагностицират промените в генотипа и при пациенти с подобни промени в броя копия (CNVs) се търсят общи клинични симптоми.

Приложение на array CGH [Ooslander *et al.*, 2004]:

- откриване на субмикроскопски аберации;
- определяне на критичните региони за дадена болест;
- изясняване на генотип-фенотип корелации;

Преимущества и ограничения на метода

Ooslander *et al* (2004) систематизират основните предимства и недостатъци на array CGH като метод за диагностика.

Преимущества:

- може да се анализира целия геном с един експеримент, което се равнява на хиляди независими FISH-хибридизации;
- висока резолюция, стандартната резолюция варира от 1 до 5Мв, но тя може да бъде повишена до приблизително 40кв чрез добавяне на допълнителни клонове;
- малък брой фалшиво-положителни сигнали и най-често няма фалшиво-отрицателни сигнали.

Ограничения:

- не открива аберации, които не водят до небалансирани геномни изменения (балансиран хромозомни преустройства, инверсии, полиплоидии);
- полиморфизми по отношение броя копия в популацията затрудняват интерпретацията на получените резултати
- все още скъп и трудно достъпен за масово приложение метод

Въпреки че не е напълно изяснен ефекта от наличието на мозаицизъм за развитието на ембриона и изхода на бременността, е доказано преимплантационно наличието на мозаичен абнормен кариотип в *in vitro* създадени ембриони [Bielanska *et al.*, 2002]. Мозаицизмът е най-чест през първия триместър от бременността,

намалява през втори триместър и най-рядко се среща при живородени. Мозаицизъм се открива при 5% от спонтанните аборти вследствие на анеуплоидии през 6-20 г.с. и в хорионни биопсии при 12% от бременностите. Значителното намаляване на мозаицизма от ранните към по-късните срокове на бременността говори за наличието на селекция срещу него. Независимо от това диагностицирането на нискостепенен мозаицизъм за клинично значими хромозомни аберации остава предизвикателство за цитогенетичния анализ до появата на array CGH. Първото системно проучване за мозаицизъм в голяма кохорта чрез array CGH успява да идентифицира наличие на мозаицизъм в 3% от изследваните клетки [Ballif *et al.*, 2006]. Чрез array CGH се открива изненадваща честота на мозаицизма в популацията от индивиди с умствена недостатъчност и/или дисморфични стигми (8-10). Може би най-важно е, че при array CGH не се изисква стимулация на клетъчните култури с фитохемаглутинин като при класическия цитогенетичен анализ, което може да промени процента на клетките с мозаицизъм и да затрудни идентифицирането на някои мозаични аберации при кариотипиране [Cheung *et al.*, 2007].

Ролята на array CGH за идентифициране на структурни варианти

Последни проучвания установяват, че средният размер на делеция/дупликация е 15 kb и се срещат с честота 0.14 / поколение [Tuzun *et al.*, 2005; van Ommen, 2005]. Поради тази причина е изчислено, че структурните варианти представляват приблизително 2000 bp от новите генетични варианти във всеки индивид, което е около 20 пъти повече от приблизително 120-те нови еднонуклеотидни замени случващи се при всяко поколение [Kondrashov, 2003]. Изчислено е, че SNPs се срещат веднъж на всеки 1200 bp в човешкия геном, или общо са $2-2,5 \times 10^6$ полиморфни бази двойки [International HapMap Consortium, 2005]. От друга страна е изчислено, че CNVs се срещат приблизително 250 пъти в генома, със среден размер 15 kb, което представлява общо 4×10^6 бази двойки от полиморфизми в броя копия. [Tuzun *et al.*, 2005].

По-долу са представени накратко различните типове структурни хромозомни варианти и ролята им в патологията при човека.

Сегментни дупликации

Анализи проведени *in situ* и *in silico* показват, че дублицираните последователности съставят приблизително 5% от човешкия геном [Cheung *et al.*, 2001; Cheung *et al.*, 2007]. Сегментните дупликации или нископовторени последователности (LCRs) са ДНК сегменти с големина 1-500 kb, представени с множество копия в генома и 90-99% идентичност на секвенцията. Те често са разпръснати из целия геном, но особено богати на LCRs са субтеломерните и перицентромерните райони на хромозомите. Субтеломерните LCRs са ~ 40%, а перицентромерните ~ 30% от всички LCRs в генома [Linardopoulou *et al.*, 2005]. Различни изследователски групи докладват за наличието на сигурна връзка между наличието на LCRs в даден геномен район и появата на хромозомни преустройства, някои от които свързани с определени генетични заболявания [Armengol *et al.*, 2003; Sharp *et al.*, 2005]. Поради високата хомоложност на секвенциите им и разположението им в генома, LCRs често служат като субстрат за структурни преустройства чрез неалелна хомоложна рекомбинация и съответно служат като катализатор за хромозомната нестабилност [Sharp *et al.*, 2005; Tuzun *et al.*, 2005].

Транслокации

При Робертсоновата транслокация има обмяна между целите дълги рамена на акроцентричните хромозоми (13, 14, 15, 21 и 22 при човека). Те са едно от най-честите хромозомни преустройства, срещат се при 1:1000 индивиди. Диагностицирани са всички възможни комбинации между акроцентриците, като 85% се падат на rob(13q14q) или rob(14q21q). При реципрочните транслокации се обменя генетичен материал между две хромозоми. Честотата им е 1:625 раждания и могат да бъдат засегнати всички хромозоми. Въпреки че повечето случаи са уникални за семействата в които са изолирани, някои транслокации като t(11;22)(q23;q11.2) са относително по-чести. Един от основните въпроси при конвенционалния цитогенетичен анализ е дали видимо балансираните транслокации са съпроводени с микробрации с ефект върху фенотипа. Чрез array CGH с резолюция 1Мв е установена висока честота на микроделеции/микродупликации в тези случаи [Klein *et al.*, 2004; Tyson *et al.*, 2004; Gribble *et al.*, 2005].

Субмикроскопски делеции

Няколко различни техники, използващи микрочипове, позволяват геномът да бъде скриниран за субмикроскопски аберации. Едно от първите проучвания води до идентифицирането на 76 локуса, асоциирани с полиморфизми по броя копия [Sebat *et al.*, 2004]. Iafrate и сътрудници (2004) използвайки бактериални изкуствени хромозоми (Bacterial Artificial Chromosomes, BAC) откриват 255 района в генома, които показват вариации в броя копия. Методите използвани в тези две проучвания са с резолюция ~100 kb - 1 Mb. По-съвременни методи, използващи микрочипове базирани на SNP позволяват разкриването на аномалии по-малки от 5 kb [Conrad *et al.*, 2006]. Последни данни показват, че приблизително 5% от заболяванията с Менделова наследственост са следствие на микроделеции или микродупликации, които представляват най-честите структурни варианти в човешкия геном. [Tuzun *et al.*, 2005].

Тандемни повтори

Тандемните повтори са съставени от различен брой повтарящи се сегменти, чиято големина може да достигне няколко стотин хиляди бази двойки. Най-често тези повторени елементи не са транскрипционно активни, но са известни и няколко гена като глутатион- S-трансфераза M1 (*GSTM1*) и амилаза алфа 1A (*AMY1A*), които са част от тандемни повтори [Siwach and Ganesh, 2008]. Поради тяхната повтаряща се природа, експанзията и скъсяването на тандемните повтори вероятно е следствие на неалелната хомоложна рекомбинация.

Инверсии

При инверсиите е налице промяна в ориентацията и/или локализацията на ДНК сегменти в дадена хромозома и по принцип не са свързани със загуба или удвояване на генетичния материал. Те се приемат за балансирани преустройства и не могат да бъдат открити чрез array CGH, която диагностицира само промяната в броя копия на ДНК. Въпреки че при инверсия могат да бъдат нарушени кодиращи райони в местата на прекъсване, тъй като те не водят до промяна в броя копия не са свързани със значителни последствия за фенотипа. Голяма част от инверсиите не се диагностицират поради технически ограничения, въпреки това те са свързани с неголям брой заболявания [Gimelli *et al.*, 2003]. Инверсиите повишават риска от

други генетични преустройства, най-често това са загуба или удвояване на генетичния материал близо до местата на прекъсване [Tuzun *et al.*, 2005; Hadjidekova *et al.*, 2011].

Еухроматични варианти

Описани са няколко фамилии с небалансирани хромозомни аномалии, които са без значим фенотипен ефект [Barber, 2005]. Въпреки че в повечето случаи подобни аберации се откриват само в единични семейства, някои се срещат често в общата популация и се наричат еухроматични варианти. Изглежда, че те се появяват следствие на експанзия на високополиморфни варианти в броя копия и се срещат най-вече в периферните райони на хромозомите, където често има и сегментни дупликации и в по-малка степен в субтеломерните райони. Пример за това е амплификацията на duplication cassette съдържаща псевдогените *GABRA5*, *NF1* и *IGHD*, локализирана в периферния район на хромозома 15q, проксимално от делецията причиняваща синдромите на Prader-Willi / Angelman (PWS/AS). Тази сегментна дупликация се среща най-често в едно до четири копия в общата популация, но може да бъде открита и в повече от 20 копия в индивиди с цитогенетично видим допълнителен еухроматичен материал.

Array CGH и идентифицирането на CNVs в човешкия геном. Налични бази данни

Подобряването на резолюцията на array CGH доведе до широко приложение на този метод в медицинските проучвания и диагностика. Той често се използва за идентифициране на редки, но с висока пенетрантност и често единични CNVs при пациенти с психични заболявания - аутизъм [Sebat *et al.*, 2007], шизофрения [Walsh *et al.*, 2008.; Stefansson *et al.*, 2008], умствена недостатъчност [Friedman *et al.*, 2006; Wagenstaller *et al.*, 2007]. CNVs обаче напоследък се приемат и като честа форма на структурен вариант на генома: чрез array CGH и секвениране е възможно да бъдат идентифицирани 600-900 CNVs в един индивид [Korbel *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008]. Следователно при клинична интерпретация на резултати от споменатите изследвания трябва да се съпоставя честотата на CNVs при засегнати и здрави индивиди и да се определя унаследяването на CNVs чрез анализ на родителите [Koolen *et al.*, 2009]. Увеличаването на резолюцията на array CGH доведе до

установяване на по-висока честота на редките CNVs и до увеличаване на броя локуси с вариабилно унаследяване и пенетрантност [McMullan et al., 2009]. Ограничаващо е схващането, че CNVs са бенигнени, когато са чести и унаследени, а са патологични когато са редки и *de novo* възникнали. Понастоящем е установено при изследване на здрави контроли, че над 5% от човешкия геном е съставен от вариабилен брой копия и нови CNVs продължават да се откриват [Perry et al., 2008;]. Известните до момента CNVs могат да бъдат открити в База данни на геномните варианти (Database of Genomic Variants - DGVs) (<http://projects.tcag.ca/variation>). Както беше споменато по-горе, при много пациенти с неврологични заболявания се откриват субмикроскопски делеции и дупликации, които променяйки броя копия на доза-чувствителни гени или нарушавайки генната експресия, водят до поява на заболяването. Много от тези аберации са нови или изключително редки, което затруднява клиничната им интерпретация и прави несигурна фенотип/ генотип корелацията. Откриването на пациенти с едни и същи генетични преустройства и общи фенотипни прояви потвърждава патогенността на съответното генетично преустройство и позволява дефинирането на нови синдроми. За улесняване на интерпретацията при такива редки аберации е създадена интерактивна база данни, наречена DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources; <http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/>) (Wellcome Trust Sanger Inst. 2007). В DECIPHER са катологизирани честите CNVs в нормални индивиди и това позволява, с някои изключения, промените в генома, които са нови и потенциално патогенни да бъдат по-лесно идентифицирани. В DECIPHER са изброени и познатите, клинично-значими и с предсказуема функция гени, намиращи се в района на съответната аберация. Благодарение на DECIPHER медицинските специалисти от цял свят, след информирано съгласие от пациента, могат да обменят информация, което е важно за натрупване на данни за фенотипната изява на редките генетични преустройства [Firth et al, 2009].

При откриване на *de novo* възникнали микроделеции и микродупликации при пациенти с изразен фенотип, това е доказателство, че преустройствата и

съответния фенотип са причинно свързани. Когато небалансираните геномни изменения са унаследени от фенотипно здрав родител, са възможни два варианта:

- тези геномни изменения не са причина за заболяването и представляват генетичен полиморфизъм
- унаследените делеции и дупликации са патогенни, но са с непълна пенетрантност във фенотипно здравите родители или е налице импринтинг [Rosenberg *et al.*, 2006].

8.4 Секвениране по Sanger (таргетно секвениране)

ДНК – секвенирането е процес на разчитане на последователността от нуклеотиди в молекулата на ДНК [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020]. Първият комерсиализиран метод е секвенирането по Сангер (Фредерик Сангер – двукратен носител на Нобелова награда). Известно е още като верижно терминационен метод (“chain termination method”) и протича в следните основни стъпки:

- Генериране на ДНК фрагменти с вариращи дължини, като всеки фрагмент завършва с белязан нуклеотид, наречен дидезоксинуклеотид. В реакционната смес участват следните компоненти: ДНК праймери, нуклеотиди за синтез на веригата, ензима ДНК полимераза, ДНК матрица и белязани нуклеотиди, които терминират синтеза. Синтезирането на нова ДНК верига не може да продължи след свързването на терминатор, така че всеки фрагмент завършва с различно белязан нуклеотид.
- Втората стъпка е да се разреждат синтезираните фрагменти по размер чрез капилярна гел електрофореза. При това разделяне късите фрагменти се придвижват по-бързо в гела от дългите.
- В третата стъпка става лазерно възбуждане на терминалния белязан нуклеотид на края на всеки синтезиран фрагмент. Всяка база е белязана с различен цвят (общо четири), така че детекцията на определен цвят отговаря на наличието на съответната база. Белязаните нуклеотидни

вериги терминират синтеза на ДНК, тъй като нямат 3'-ОН, необходима за удължаване на веригата.

При всяка реакция се генерират копия на ДНК фрагменти с различна дължина, терминирани на различни позиции от един от четирите дидезоксинуклеотида. Реакционният микс се зарежда в секвенционна машина (секвенатор), където става капилярна електрофореза за разделяне на ДНК фрагментите по размер [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020]. Съвременните капилярни секвенатори могат да анализират едновременно 8-96 проби.

8.5 NGS – секвениране от ново поколение

Новогенерационното секвениране (NGS), известно още като секвениране от ново поколение, е термин, описващ голям брой различни секвенционни технологии [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020]. Те дават възможност за разчитане на ДНК и РНК по-бързо и по-евтино в сравнение със секвенирането по Сангер. NGS – платформите анализират милиони и дори милиарди секвенции едновременно (голям мащаб на анализа) и извършват своеобразна революция в геномиката и молекулярната биология. При класическото секвениране по Сангер в една реакция се разчита секвенция от около 1 кб, докато при NGS се разчитат 300 гб ДНК в една реакция. Общи черти на платформите:

- Подготовка на пробата за анализ – изготвят се библиотеки от фрагменти на изходната ДНК, които се лигират с адапторни секвенции
- Секвениране – всеки фрагмент се прикрепва от адапторите към твърда повърхност (частици, силикон). Фрагментите се размножават с PCR и генерират клъстери (съвкупност от една и съща секвенция), които се разчитат е единична секвенционна реакция. Това става чрез отделяне на сигнал (флуоресцентен, светлинен или друг) при добавяне на нуклеотиди към синтезиращата се верига.
- Софтуерен анализ на суровите данни от разчитането на ДНК секвенцията.

Разликите между отделните NGS-платформи са главно в техническите детайли на секвенционната реакция. Освен за разчитане на ДНК, NGS технологията е разработена и за разчитане на РНК от клетки и тъкани (т.нар. транскриптомен анализ), както и за определяне на хистоновите модификации в генома и взаимодействията протеини-ДНК [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020].

Новогенерационното секвениране представлява най-бързият, точен и икономически ненаатоварващ метод за диагностика на генетични дефекти. Съществуват различни (комерсиални) NGS панели, които са специфични за гените, отговорни за краниосиностоза. Тези панели стоят в основата на диагностиката на моногенните краниосиностозни синдроми.

8.6 Цялостно екзомно секвениране (WES), цялостно геномно секвениране (WGS)

Екзомното секвениране, познато още като цялостно екзомно секвениране (whole exome sequencing – WES) е геномна техника за секвениране на всички протеин-кодиращи региони от гените в генома (съвкупността от тези региони се нарича – екзом) [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020]. Процеса се поделя на две стъпки:

- Първата стъпка цели да селектира само протеин-кодиращите ДНК участъци – т.нар. екзони. При човека са познати около 180 000 екзона, което съставлява около 1 % от генома, или приблизително 30 милиона базови двойки.
- Втората стъпка е секвениране на „екзонната“ ДНК, използвайки високо-технологични секвенатори.

Целта на този метод е да се идентифицират генетични варианти, които водят до значими промени в кодираните протеини, което намира широко диагностично приложение в съвременната клинична генетика. Цялостното екзомно секвениране е сравнително икономически изгодно (в сравнение с WGS), което го прави достъпно за все по-голям брой пациенти.

От друга страна цялостното геномно секвениране (whole genome sequencing, complete genome sequencing, full genome sequencing) е процес, който разкрива цялата (или почти цялата) ДНК последователност в генома на даден организъм [Тончева, Хаджидекова *и сътрудници* 2020]. Това включва и митохондриалната ДНК. Методът е авангарден, но все още твърде скъп, което силни лимитира приложението му в ежедневната диагностична практика.

9. Диагностичен подход при деца с краниосиностоза

Почти 130 години след първото системно описание, краниосиностозата продължава да бъде диагностично предизвикателство. Това се дължи на изключително хетерогенната етиология и патоанатомия, както и на разнообразието от клинични прояви на това състояние.

Диагностичният процес винаги започва с внимателно снемане на изчерпателна анамнеза – както лична, така и фамилна. Необходимо е да се уточнят особеностите на бременността, тъй като многоплодните бременности, олигохидрамниона и анатомичните аномалии на плода и на майката са рискови фактори за възникването на екзогенна краниосиностоза. Следва събиране на информация относно раждането. При раждане по естествен механизъм, особено когато са прилагани методи за подпомагане на процеса (мануална екстракция, форцепс, тракция) може да възникне компресия на черепа с последваща краниална деформация и стеноза. Голяма част от тези рискове се избягват при оперативно родоразрешение. Анамнестичното търсене продължава с информация за психо-моторното развитие на детето, което може да покаже значителни отклонения. Важно е, насочено да се потърсят белезите на повишено вътречерепно налягане – хронично главоболие, зрителни и слухови нарушения, нервно-психично изоставане, пароксизмални прояви. Уместно е да се събере информация за други заболявания, които могат да се асоциират с краниосиностоза. Такива са: всички дефекти на калциево-

фосфорната обмяна, ендокринопатии, анемии, метаболитни болести и хромозомни аберации.

След анамнестичното интервю, диагностичния процес задължително преминава към снемането на щателен физикален статус. Освен познатите в педиатрията, общи правила за клиничен преглед, при деца със съмнение за краниосиностоза се обръща специално внимание на няколко допълнителни момента. Статуса винаги трябва да започва с прецизна антропометрия, като се отчитат два основни параметъра – обиколка на главата и краниален индекс (виж точка 3). Огледа и палпацията дават информация за формата на черепа, като се търсят проминиращи сутури, оценява се състоянието на фонтанелите. Следи се за атипична краниална конфигурация и лицева асиметрия. Подробно се описва и документира краниофациалния дисморфизъм (включително и с фотографии, след получаване на разрешение от пациента или неговите настойници).

Ако информацията, придобита от анамнезата и физикалния статус на пациента води до съмнение за краниосиностоза се прибегва до образна диагностика. В продължение на много години, златен стандарт в диагностиката на тези краниални деформации беше рентгенографията. Използват се фасова и профилна краниография, които се интерпретират от специалист по образна диагностика. Ако е необходимо могат да се анализират и допълнителни проекции. При технически правилно изпълнена рентгенография и точна интерпретация се разпознават близо 80-90 % от анатомичните особености на повечето разновидности на краниостенозата. За да бъде пълноценен този диагностичен подход, е необходима професионалната оценка от образен специалист с достатъчен опит в интерпретацията на краниални деформации. През последните 10 години, образната диагностика на краниостенозата се доминира от компютърната томография. Тя предлага много по-детайлен образ, както на костите, така и на прилежащите меки тъкани на черепа. Съвременната дву- и триизмерна томография дават възможност за прецизна диагностика и на най-минималните краниални деформации. Чрез софтуерни програми се визуализира и триизмерна реконструкция на черепа. Информацията от тези техники, не само доказва наличието на краниосиностоза, но и определя избора на терапевтичен подход.

Ядрено-магнитния резонанс е показан само при необходимост от точна оценка на състоянието на меките тъкани, главния и малкия мозък. Образните изследвания стоят в основата на диагностичния процес при деца с краниосиностоза, като директно визуализират анатомичния дефект и неговите патоанатомични последствия. В България, все още до голяма степен се разчита на конвенционалните рентгенографски техники, поради тяхната техническа и икономическа достъпност. КАТ с допълнителна реконструкция се използва по-рядко при по-комплексни случаи.

При съмнения за ендегенна краниосиностоза се преминава към генетично уточняване. Този процес започва с конвенционално цитогенетично изследване, което открива по-големите хромозомни аберации. Миркочипов (aCGH) и микроделеционен анализ (MLPA) се използват за идентифициране на по-фини, субмикроскопски дефекти. Новогенерационните панели и екзомното секвениране са последния етап и обикновено финализират генетичната верификация.

Когато се установят усложнения на първичния краниален дефект се налагат консултации с различни специалисти и допълнителни изследвания. Преглед от детски невролог (ЕЕГ), офталмолог, стоматолог, УНГ-специалист (аудиометрия) и ендокринолог могат да дадат допълнителна яснота и често са необходими. Пълноценният диагностичен подход при деца с краниосиностоза изисква колаборация с широк мултидисциплинарен екип.

10. Терапевтичен подход при деца с краниосиностоза

Терапевтичното поведение при деца с краниосиностоза се определя от броя и вида на засегнатите шевове, магнитуда на фацио-краниалната деформация, състоянието на анализаторите и наличието на белези на повишено вътречерепно налягане [Renier *et al.* 2000; Derrick *et al.* 2008; de Jong *et al.* 2013; Forrest *et al.* 2013].

Подходът може да бъде оперативен и консервативен. Позиционните плагицефалии и минималните, изолирани краниосиностози (при които няма

усложнения) са обект на консервативните методи. Те започват с елементарна корекция на позицията на детето в леглото, което повлиява повечето „козметични дефекти“. Модерен неоперативен подход е и поставянето на специални устройства (корекционни шлемове), които целят механична корекция на черепната деформация. Необходимостта за поставяне на корекционен шлем се оценява от мултидисциплинарен екип, в който задължително присъства неврохирург. Шлемовете имат механизми, чрез които се адаптират към анатомичните особености на конкретния пациент. Необходимото време за носене на корекционен шлем варира според тежестта на стенозата и скоростта и степента на подобрение. Децата с подобни коригиращи устройства се проследяват в неврохирургични клиника на определени интервали.

Оперативния подход за корекция на краниосиностозата е показан при тежки деформации с повишено вътречерепно налягане, пароксизмални прояви, аномалии на анализаторите и намалена проходимост на ГДП [Mundinger *et al.* 2016; Lin *et al.* 2015; de Jong *et al.* 2013]. Основните цели на неврохирургичното лечение на краниостенозата са увеличение на интракраниалния обем, редукция на повишеното вътречерепно налягане и осигуряване на пространство за нормално нарастване на мозъка и черепа [Swanson *et al.* 2016]. Не без значение е оперативната корекция на тежкия лицев дисморфизъм и асиметрия. Въпреки, че по литературни данни няма единодушие по отношение на възрастта, която е най-подходяща за оперативната намеса, повечето неврохирурзи предпочитат периода между 3 и 12 месеца [Lin *et al.* 2015; Ardalan *et al.* 2015; Abu-Sittah *et al.* 2016; Taylor *et al.* 2001]. Възрастта на операция зависи и от вида на избраната хирургична техника. Минимално инвазивните техники, които разчитат на динамична краниална алтерация се провеждат по-рано, за да се използва периода на интензивен растеж на калварията.

При метопична краниостеноза, оперативната намеса цели да нормализира челото и супраорбиталните костни структури. При пациенти, които се презентират с изолиран дефект на самия метопичен шев е подходящо да се контурира фронталната кост или да се отстрани сквамата с последваща реконфигурация. При тежка тригоноцефалия се провежда фронто-орбитална реконструкция, а при

сигнификантен хипотелоризъм, може да се наложи поставянето на костен автоимплант по срединната линия.

Оперативните намеси при едно- и бикоронарна синостоза целят да възстановят анатомията както на фронталната кост, така и на орбитите. Показан е билатерален фронто-орбитален авансмент.

Хирургичната корекция на сагиталната краниосиностоза остава спорен въпрос. Подходите варират от минимални намеси с отстраняване на част от съчленения шев и натрупана костна маса до тотална калвариектомия с реконфигурация.

Неврохирургичното лечение на синдромните краниосиностози е допълнително усложнено от придружаващите аномалии. За постигане на задоволителна анатомична корекция са необходими мултикомпонентни оперативни намеси, провеждани на няколко етапа. Терапията започва с декомпресия (при установяване на диагнозата), продължава с краниотомия (3 месеца по-късно), ремоделиране с или без дистракционна остеогенеза и фронто-орбитална реорганизация (4-12 месеца след първичната намеса), среднолицев авансмент (около 6-12 месеца по-късно) и завършва с ортогнатна хирургия (ако е необходима) около 18 месеца след декомпресионната операция.

Оперативното лечение на краниосиностозите е свързано със значителна интраоперативна кръвозагуба (достигаща 25% от циркулиращия обем). Въпреки това анатомичните и естетични резултати са много добри, а средния болничен престой рядко надвишава 4 до 7 дни. Реоперации се налагат при 7.2 % от несиндромите и до 23.3 % от синдромните краниосиностози.

III. Цел и задачи

1. Цел

Целта на настоящия дисертационен труд е да се разкрият и характеризират клиничните прояви и генетични нарушения, които играят роля в етиологията и патогенезата на изолираната и синдромна краниосиностоза.

2. Задачи

1. Да се направи анализ на морфологичните и антропометрични характеристики при група от деца с доказана чрез образни изследвания краниосиностоза.
2. Да се определи типа и етиологичната роля на цитогенетичните нарушения.
3. Да се изследват пациентите за микрострукторни небалансирани хромозомни аберации чрез MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации и цялостно геномно скриниране с array CGH и да се определи тяхната роля като вероятен етиологичен фактор.
4. Да се установят молекулните характеристики и честотата на мутации в известни гени (*FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1* и др.) свързани с появата на моногенни синдромни краниостенози.
5. Да се определи ролята на базовите замени (в гени различни от изброените в задача 4) като фактор в етиологията на изолираната и синдромна краниосиностоза.
6. Да се направи сравнение и оценка на ефективността, приложимостта и показанията за провеждане на генетични изследвания с различна резолюция.
7. Да се анализира ролята на вродените грешки на обмяната като фактор в етиологията на краниостенозата.
8. Да се създаде ДНК банка от деца с краниостенозата и родителите им за извършване на генетични и геномни изследвания.

9. Да се изготви практически приложим диагностичен алгоритъм за деца с краниосиностоза.

IV. Методи и материали

1. Участници в проучването

В настоящият дисертационен труд са включени 99 деца, хоспитализирани в Отделението по Клинична генетика на СБАЛДБ от 2017 до 2021 година (4 годишен период).

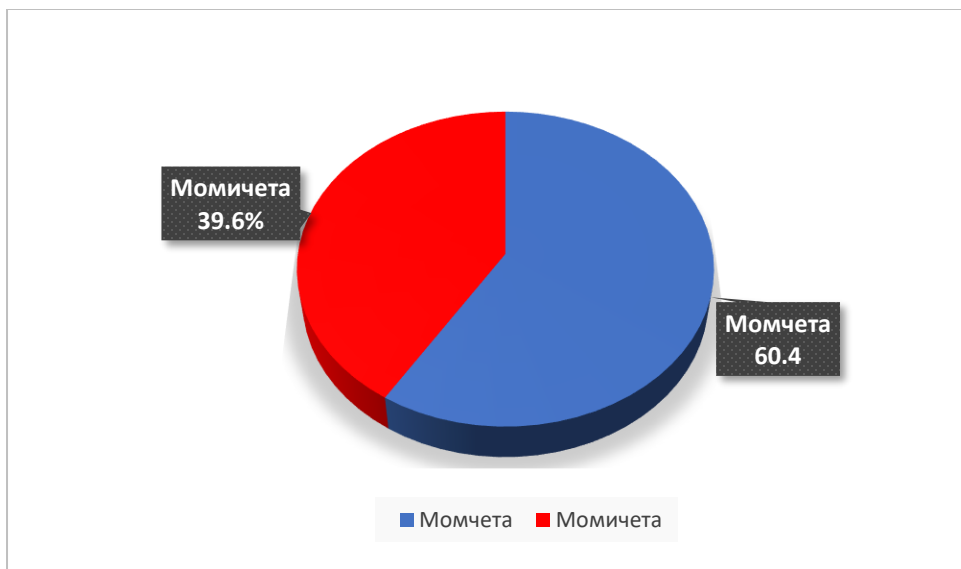
Критерий за включване:

- наличие на краниосиностоза, доказана и документирана чрез валидни образни изследвания;
- подписано (от родителите или законните настойници на детето) информирано съгласие за участие;
- подписано съгласие за провеждане на генетични изследвания (конвенционална цитогенетика, MLPA, aCGH, NGS).

Критерии за изключване:

- наличие на категорични данни за екзогенна краниосиностоза;
- официален отказ от участие в проучването;

Разпределението по пол показва: 60 момчета (60.4%) и 39 момичета (39.6%).



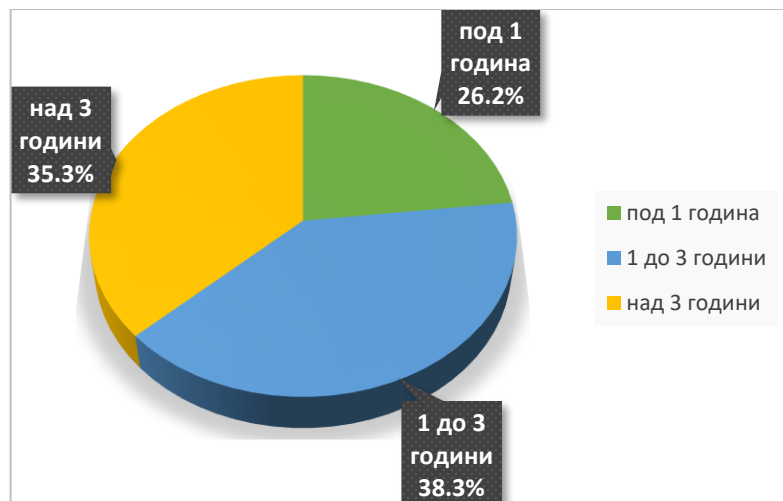
Фигура 34: Разпределение на изследваните деца по пол

Възрастта е определена при първичната хоспитализация в Клинична генетика, когато е поставена диагнозата.

Разпределението по възраст беше следното:

- до 1 година: 26 деца (15 момчета и 11 момичета)
- от 1 до 3 години: 38 деца (25 момчета и 13 момичета)
- над 3 години: 35 деца (20 момчета и 15 момичета)

Най-младият пациент беше на 22 дни, а най-възрастният на 10 години и 6 месеца.



Фигура 35: Разпределение на изследваните деца по възраст

Родителите (настойници) на всички деца дадоха писмено информирано съгласие за участие, което включва следните елементи:

- съгласие за участие в проучването;
- съгласие за взимане и обработване на кръвни проби;
- съгласие за провеждане на образни изследвания;
- съгласие за провеждане на цитогенетично и други генетични изследвания;
- съгласие за медицински фотографии на пациентите;
- съгласие за набиране и обработване на лични данни;
- съгласие за публикация на данните и резултатите от проучването в рамките на академични и научни форуми.

2. Клинична оценка на пациентите

Подходът за клинична оценка, който приложихме при всички деца от изследваната група, се състои от следните етапи:

1. Анамнеза
2. Антропометрия
3. Физикален статус (дисморфологична оценка)

4.Параклинични изследвания

5.Образни изследвания

- Анамнестична информация – подробна анамнеза (персонална и фамилна) снета от всички пациенти и техните семейства.
- Антропометрия – основните показатели (тегло, ръст и обиколка на глава) бяха измерени при всички деца при хоспитализациите в Клинична генетика. Използва се метода на стандартен индекс на отклонение (SDS) за оценка, сравнение и систематизация на получените измервания.
- Физикален преглед – при всички деца е снет пълен физикален статус с акцент върху размерите, формата и състоянието на черепа както и наличието на кранио-фациален дисморфизъм. Дисморфологичните находки се документираха чрез стандартна фотография, след изричното информирано разрешение от страна на родителите/настойниците.
- Параклинични изследвания – показателите на калциево-фосфорната обмяна (серумното ниво на общ калций, йонизиран калций, фосфор, магнезий; нивата на алкална фосфатаза, паратхормон, калцитонин и витамин D) се оцениха при голяма част от пациентите. Допълнителни лабораторни изследвания се провеждаха според показанията при конкретния пациент.
- Образни изследвания (конвенционална рентгенография, компютърна-аксиална томография, ЯМР) – основния метод за образна диагностика беше конвенционалната краниография в две проекции – анфас и профил. В редки случаи се наложи интерпретация на допълнителни проекции или контролни рентгенографии. При част от децата се проведе компютърна-аксиална томография като основен метод за визуализация и доказване на краниосиностоза. При по-комплексните случаи се прибегна до комбинация от образни техники и интерпретация от различни специалисти. При част от децата, като допълнителен метод за уточняване

на състоянието на мозъка се проведеха ЯМР и трансфонтанелна ехография (ТФЕ).

3. Биологични проби

От всеки участник е взета венозна кръв чрез затворена вакутейнер система при спазване на стандартните процедури за стерилност. За изолирането на ДНК кръвта е събирана във вакутейнери с EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic A) (4 ml) и съответно с Li-Heparine (4 ml) за изготвяне на лимфоцитни култури. Кръвта е вземана до един час след нахранване (във връзка с постпрандиалната левкоцитоза) и съхранявана на +4°C до транспортирането в лабораторията на Катедрата по медицинска генетика или до Национална Генетична Лаборатория към СБАЛАГ Майчин дом. Изолирането на ДНК е извършвано не по-късно от 24 часа след вземане, а поставянето на лимфоцитни култури в рамките на същия ден. След изолирането на високомолекулна геномна ДНК, тя е съхранявана в разтворено състояние в буфер при -20°C в ДНК-банката на Катедрата по Медицинска генетика. При провеждането на експериментите са съблюдавани правилата на добрата лабораторна практика за безопасна работа с биологичните агенти - ръкавици, очила, ламинарни боксове, отделни стаи за ДНК изолиране, стерилни камери, стерилни съдове, специални контейнери за отпадъците.

4. Методи за генетичен скрининг

Методите за генетичен скрининг се проведеха в следната последователност:

- 4.1 Конвенционален цитогенетичен анализ (кариотипиране)
- 4.2 Микроделеционен анализ (MLPA – за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации)
- 4.3 Сравнителна геномна хибридизация (oligo - arrayCGH)
- 4.4 Новогенерационно секвениране (NGS)

Етапи 3 (oligo - arrayCGH) и 4 (NGS) се провежда само при деца със съответните показания.

4.1 Конвенционален цитогенетичен метод

Конвенционалната цитогенетика като начална и задължителна стъпка от генетичния скрининг се провежда при всички деца. Използвахме резолюция – 550 ленти на хаплоиден набор и G-банд оцветяване. Анализираха се по минимум 10 метафазни пластини при всяко дете в селектираната група. Прецизната хромозомна локализация и размери на установените аберации се уточниха допълнително чрез *array CGH*.

Реактиви: Lymphochrome - готова комплексна среда за култивиране на лимфоцити от периферна кръв; колцемид; 0,75 моларен хипотоничен разтвор на KCl; пресен фиксатор от метанол и ледена оцетна киселина в съотношение 3:1 на -20°C.

Апаратура: стерилен ламинарен бокс; центрофуга; устройство за разбъркване Vortex-Genie 2; термостат на 37°C.

Техника: техниката на рутинния цитогенетичен анализ, провеждан на краткосрочни лимоцитни култури, включва няколко основни етапа: 1) поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв; 2) изготвяне на микроскопски препарати; 3) оцветяване на препаратите; 4) микроскопски анализ

4.1.1 Поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв

Средата за култивиране се разлива по 5 ml в стерилни флакони за култивиране. За всеки пациент се посяват 2 култури, като се работи в стерилен ламинарен бокс. Във всеки флакон се добавя съответното количество кръв. За

култивиране се предпочита прясно взета кръв, но при съхранение до 5 дни при 4°C също може успешно да се култивира. Кръвта трябва се взема в епруветка с Li- или Na-хепарин или с Na - цитрат като антикоагулант. Количество кръв за 5 ml култура:

- новородени – 0,1 ml
 - деца до 5 год. – 0,5 ml
 - деца над 5 год. и възрастни – 0,5 ml
- Инкубира се на 37°C за 68 - 72 часа.
 - Между 68 и 72 час към културата се добавя 0,05 ml колцемид.
 - Инкубира се за 25 min в термостат на 37°C.
 - Културата се прехвърля в центрофужна епруветка.
 - Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.
 - Отпипетира се надстоящата течност
 - Утайката се разбива.
 - Добавят се 5 ml предварително темперирани на 37°C хипотоничен разтвор на KCl.
 - Инкубира се 10 min в термостат при 37°C.
 - Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.
 - Отпипетира се супернатанта, утайката се разбива и се добавят 5 ml пресен студен фиксатор.
 - Горните две стъпки се повтарят още два пъти. Центрофугира се за 10 min на 1000 оборота.
 - Отпипетира се супернатанта.
 - Утайката се ресуспендира в малко количество пресен фиксатор и се съхранява на -20°C.

4.1.2 Изготвяне на микроскопски препарати

Апаратура: нагревателна плоча.

Техника (накапване на фиксираната лимфоцитна суспензия върху предметни стъкла):

- Предметните стъкла, предварително обезмаслени за 24 часа в абсолютен алкохол се изплакват и се охлаждат в дестилирна вода до 0-4°C.

- За накапване се използва охладена клетъчна суспензия. Преди накапването епруветките може да се оставят за 30 min във фризер - за по-добро фиксиране и разпръскване на хромозомите.
- Накапването се прави от височина 25-30 cm на хоризонтално разположени студени, мокри стъкла.
- Стъклата леко се отцеждат и се сушат на въздух при стайна температура наклонени под ъгъл 60°.
- Всеки препарат се надписва: амбулаторен номер на пациента, година, номер на посявката, номер на стъклото, абривиатура на оцветителната техника.
- Изсушените препарати се поставят за 45-50 min на термостатна плоча нагрята до 100°C.

Оцветяването започва след като препаратите се охладят до стайна температура.

4.1.3 Оцветяване на препаратите с GTG-техника

Апаратура: светлинен микроскоп с увеличение 1000 пъти

Реактиви: PBS (4 g NaCl, 0.1 g KCl, 0.46 g Na₂HPO₄, 0.1 g KH₂PO₄, 500 ml dH₂O), трипсин, буфер KH₂PO₄, буфер Na₂HPO₄.

Техника (приготвяне на батерията за оцветяване):

I-вата кювета (стайна температура): 15 mg трипсин в 75 ml PBS

Престой на препаратите: 1–2 min (времето на престой се определя емпирично).

II-рата кювета (4°C): 75 ml PBS

Престой на препаратите: проплакване на стъклата

III-та кювета (4°C, pH=6.8): 34 ml буфер KH₂PO₄, 41 ml буфер Na₂HPO₄, 3,5 ml боя на Gimsa.

Престой на препаратите: от 4 до 6 min

IV-та кювета (4°C): дестилирана вода

Престой на препаратите: проплакване на стъклата. Качеството на оцветяването се контролира на микроскоп.

Оцветяват се както пресни препарати, така и препарати 7-ми ден. При експресно GTG оцветяване препаратите се пекат на електрическа плоча при 100°C за 45 min.

4.1.4 Микроскопски анализ

За анализ се избират подходящи метафазни пластинки с добре разпръснати, непокриващи се хромозоми и отчетливо лентуване. При увеличение 1000 пъти всяка метафазна пластинка се анализира за бройни и структурни хромозомни аберации. При некомплицирани случаи се анализират 12 - 15 пластинки. Ако има съмнение за мозаицизъм, броят на анализираните пластинки може да се увеличи до 100. Няколко пластинки се заснемат със CCD устройство и се кариотипират със софтуерна програма за автоматизиран анализ на метафазни хромози.

4.2 Микроделеционен анализ – MLPA

4.2.1 Определение:

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) е метод за определяне на броя на копията на (до) 45 ДНК секвенции в единична мултиплексна PCR реакция. За целите на настоящата дисертация използвахме MLPA P245 Microdeletion Syndromes за скрининг за най-честите микроделеции и MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 за субтеломерни делеции и дупликации. За потвърждение на находките, които открихме с MLPA P036 Subtelomeres Mix 1 използвахме MLPA P070 Subtelomeres Mix 2B.

4.2.2 Методология

Използват се проби, които разпознават таргетни секвенции от 50 до 100 нуклеотида. Това дава възможност MLPA да се използва при анализ на силно фрагментирана ДНК и за детекция на малки делеции/дупликации в единичен екзон.

Най-важно за анализа е генерирането на специфичните MLPA проби. Всяка проба разпознава дадена геномна секвенция и се състои от две части: ляв и десен олигонуклеотид. Всеки от тях съдържа PCR праймер и ДНК хибридизационна секвенция. MLPA реакцията протича в следните стъпки: 1-ДНК денатурация/хибридизация; 2-лигазна реакция; 3-PCR амплификация; 4-разделяне на фрагментите и 5-анализ на резултатите. Анализът на пробите се извършва с помощта на специализиран софтуер. Броят на копията се определя чрез сравнение на височината на пика за MLPA в анализирания материал и в референтен материал с известен нормален брой копия. MLPA се използва за детекция на субмикроскопски дефекти (по-малко от 5 милиона базови двойки) и намира широко приложение при деца с кранио-фациални дефекти. Микроделеционен анализ се проведе при всички деца, като втора и задължителна стъпка от генетичното уточняване.

4.3 Сравнителна геномна хибридизация (микрочипов анализ) – олигонуклеотидни микрочипове

Array CGH – целия геном на 39 от децата беше скениран за алтерации в броя на ДНК копия чрез oligo-array CGH. ДНК се изолира от периферна кръв чрез фенол-хлороформна екстракция. Използвахме OGT 4x44k формат за олигонуклеотиден микроарей с таргетна CN резолюция - 1 сонда на 52 килобази и допълнителна CN резолюция - 1 сонда на 81 килобази. Слайдовете се скенираха на GenePix 4100A двуцветен флуоресцентен скенер (Axon Instruments, Union City, CA, U.S.A.). Микроарейте се анализираха чрез CytoSureInterpret Software. Този анализ е проведен с уточняваща цел при децата с патологични находки от конвенционалната цитогенетика и микроделеционния анализ. Проведе се и при от децата с нормален кариотип, но наличие на фенотипни белези на краниосиностоза.

В настоящата работа се използва една микрочипова платформа - олигонуклеотидни микрочипове. Принципът на метода се състои в конкурентна хибридизация между белязани с различни флуоресцентни багрила (Cy3 и Cy5)

тест- и контролна ДНК с фиксирани върху предметни стъкла ДНК секвенции (олигонуклеотиди или ВАС - клонове).

4.3.1 Апаратура

- Лазерен скенер GenePix 4100A
- Хибридационна печка SciGene 777 за олигонуклеотидни микрочипове
- Водна баня
- Вортекс Vortex-Genie 2
- Центрофуга със статичен ротор за епендорфки HERMLE Z-233-MK2
- Термоциклер с капак PTC 100
- Спектрофотометър NanoDrop® ND-2000c
- Шейкър, PSU-2T, Biosan

4.3.2 Реактиви и консумативи

- Мъжка и женска контролна ДНК
- Кит за флуоресцентно белязване на ДНК, съдържащ 5X буфер, 10X dNTP, Cy3 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), Cy5 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), ехо-Klenow ензим, BlueGnome (UK, Cambridge)
- Хибридационен кит, съдържащ 2xHi-RPM буфер и 10X блокиращ агент
- Олиго буфери 1 и 2 за промиване на хибридиралиите чипове (Agilent)
- Cot-1-ДНК
- TE буфер
- Свободна от нуклеази вода
- Олигонуклеотидни микрочипове, формат 2x105K, с гъстота 105,072 секвенции, покриващи целия геном с резолюция 35 Kb (килобази) CytoChip Oligo, версия 1.1., (BlueGnome, Cambridge, UK). CytoChip Oligo микрочиповете имат две отделни полета за хибридация, даващи възможност за едновременен анализ на две проби върху един чип
- Покривни стъкла с гумени уплътнители (gasket slides) за хибридиране на олиго микрочипове

- Колонки за пречистване и концентрация на ДНК, с целулозна мембрана, с обем на стартовия материал 500 µl, диаметър на порите 30 kDa (Kilodalton), Amicon®Ultra, Millipore
- Стъклени кювети с размер 120/120/75 mm, в комплект с метални неръждаеми държатели за стъкла, Solmedia ST1100
- PCR - епруветки 0,2 ml

4.3.3 Техника

Техниката включва няколко основни етапа - 1) подготовка на пробата; 2) белязане; 3) пречистване и комбиниране на белязаните проби; 4) хибридизация; 5) промиване; 6) скениране на микрочиповете; 7) софтуерен анализ на данните.

4.3.4 Подготовка на пробата

Работи се с разтворена в ТЕ буфер високомолекулна ДНК от порядъка на 10-20 Kb, със съотношение на чистота за протеини и РНК в границите между 1.8-2.0 при дължина на вълната OD 260/280 и със съотношение за органични разтворители при OD 260/230 > 2.0. При наличие на замърсяване пробите се пречистват с помощта на протеиназа К и повторно преципитиране. В някои случаи може да се използва и по-нискомолекулна ДНК, което налага предварителна рестрикция на тестваната и контролната ДНК посредством RsaI и AluI. Тестваните ДНК на пациентите (Т1-Т8) и контролните ДНК-и (К1-К8) се разреждат със свободна от нуклеази дестилирана H₂O до 100 ng/µl работна концентрация.

4.3.5 Белязане

Белязането се осъществява на принципа на nick транслацията. Използват се рандом праймери за белязане на тестваната и контролната ДНК с различни флуорохроми, които имат различен емисионен спектър. При белязането на ДНК е важно да се работи на лед, а пробите да се пазят от пряка светлина.

Подготовка на рандом праймерите

За всяка реакция са необходими по 500 ng ДНК (5 µl от работния ДНК разтвор), които се разтварят в 21 µl dH₂O. Към всяка епруветка се добавят по 5 µl смес от рандом праймерите до краен обем от 31 µl, като се разбъркват с пипета и

се центрофугират на пулс. Реакционната смес се инкубира за 10 min на 94°C, след което веднага се прехвърля на 4°C за 5 min. Следва центрофугиране за 1 min на 6000 G.

Приготвяне на смес за белязание (labeling mix)

Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Су3 и 8 контролни ДНК, белязани със Су5)

Смесване на ДНК-те със сместа за белязание

Във всяка епруветка, съдържаща ДНК и праймери се добавят по 19 µl от сместа за белязание, като тестваната ДНК се смесва със Су3 и съответно контролната ДНК със Су5 до краен обем 50 µl. Разбърква се чрез пипетиране и се центрофугира на пулс за събиране на компонентите на дъното на епруветката.

Белязание в термоциклер

Реакционните смеси с контролните и тест ДНК-те се поставят в термоциклер със следния режим на работа: 2 часа на 37°C → 10 min на 65°C → 5 min на 4°C. Следва центрофуга за 1 min на 6000 G.

4.3.6 Пречистване и комбиниране на белязаните проби

Следва двукратно пречистване през колонки с нитроцелулозен филтър. Към всяка от пробите се добавят по 430 µl филтриран 1x TE буфер (краен обем 480 µl).

Филтруване на пробите

Колонките за пречистване на белязаните ДНК се надписват от П1 до П8 и от К1 до К8 и пробите се прехвърлят върху целулозните филтри. Центрофугират се 10 min на 14 000 G, след което филтруваната течност се отлива. При второто промиване в колонките се наливат по 480 µl филтриран 1x TE буфер и отново се центрофугират 10 min на 14 000 G. Пречистената ДНК се задържа във филтъра, поради което той се обръща на 180° в чиста епруветка и се центрофугира 1 min на 1000 G. Интересуващата ни ДНК се утаява на дъното на епруветката.

Определяне на обема на пречистените проби

Количеството на пречистената ДНК се измерва с помощта на пипета, като варира около 21 μl . Добавя се 1xTE буфер за получаване на краен обем от 41 μl .

Проверка на концентрацията на ДНК и качеството на белязане

Концентрацията на ДНК и инкорпорацията на съответното багрило в пробата се определят чрез спектрофотометър NanoDrop® ND-2000с, като се използват по 2 μl от всяка проба. Белязането се приема за успешно, ако концентрацията, инкорпорацията и чистота на пробата са в следните граници:

- Концентрация на ДНК: 100 - 200 ng/ μl
- Инкорпорация на багрилото: 4 - 8 pmol/ μl
- Чистота на пробата при 260/280 nm: 1,8–2

Комбинация на пробите с тествана и контролна ДНК

Всяка тест ДНК (39 μl), белязана със Су3 се комбинира със Су5, белязана контролна ДНК (39 μl), като се съблюдава съвпадение по пола на пациента и контролата (общ обем 78 μl).

4.3.7 Хибридизация

Смесените тествана и контролна ДНК хибридизират върху микрочипа на принципа на конкурентното свързване.

Приготвяне на хибридизационна смес

Предварително се разтваря с дестилирана вода 10x блокиращият агент, който е в лиофилизирано състояние и се инкубира 1 час на стайна температура. Към всяка проба (78 μl) се добавят:

Подготовка на хибридизационната смес в термоциклер

След вортексиране и центрофугиране пробите се слагат в термоциклер при следния режим на работа: 3 min на 95°C → 30 min на 37°C.

Накапване на хибридизационната смес върху микрочиповете

Върху покривното стъкло в средата на гумения уплътнител се накапват по 245 µl от пробата, така че течността да не докосне гумата. Върху покривното стъкло се поставя микрочипът с активната си страна към покривното стъкло, като е препоръчително е да се избягва образуването на мехури. Двете хибридизационни полета на CytoChip Oligo чипа се означават като bottom (долно поле до баркода) и top (горно поле). Микрочипът и покривното стъкло се монтират в хибридизационната касета и се завъртат няколко пъти, за да се отстранят неподвижните мехури.

Поставяне в хибридизационна печка

Микрочиповите стъкла се оставят за 40 часа в предварително подгрята до 65°C печка с ротатор на 20 оборота за 1 min.

4.3.8 Промиване

Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК.

На 40-ия час стъклата се вадят от печката и покривните стъкла се отлепят от микрочипа в първия промивен буфер на стайна температура. Микрочиповете се поставят в метален държател и се изплакват за 5 min в първия промивен разтвор в стъклена кювета с помощта на магнитна бъркалка или шейкър. Работи се на тъмно, като лабораторните съдове се покриват с алуминиево фолио. След 5 min чиповете се прехвърлят във втори промивен разтвор на водна баня на 37°C за 1 min при непрекъснато разклащане. Много бавно (10–12 sec) стъклата се вадят от разтвора с цел да не се образуват капки по повърхността на чиповете.

Съхранение

Микрочиповете могат да се съхраняват за определено време с помощта на покривни стъкла с бариера за озона в оригиналната им кутийка на тъмно и сухо място.

4.3.9 Скениране на микрочиповете

Препоръчително е микрочиповете да се скенират същия ден, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Cytochip Oligo микрочиповете бяха скенирани на двуканален лазерен скенер GenePix 4100A, с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер и 635 nm за червения лазер.

Прескениране

По време на прескенирането при резолюция от порядъка на 50 μm се получава нискорезолютивен образ, на който се идентифицират хибридизационните полета и прилежащият баркод. С помощта на софтуерна програма GenePix Pro 6.0. се огражда зоната за скениране, съвпадаща с хибридизационното поле, като по този начин се намалява нивото на фоновия шум.

Скениране

Поради голямата гъстотата на секвенциите (105,072) беше необходимо високорезолютивно скениране от порядъка на 5 μm . По време на скенирането е възможно да се настройва мощността на лазерите и/или силата на фотомултиплициращите тръби (PMT gain - photomultiplier tube), които се използват за детекция на флуоресценцията. Оптималната сила на лазерите се преценява по вида на хистограмата.

PMT - и лазерните параметри могат да се настройват само по време на същинското скениране на хибридизационното поле. Прескенирането не позволява тази операция, защото фоновият шум, баркодът и други артефакти оказват съществен ефект. Мануалната настройка позволява получаването на по-качествени образи, като веднъж настроени следващите чипове се скенират автоматично. Скенираните образи се запамятват в TIFF формат, като се означават съответно с наставка „top” или „bottom”.

4.3.10 Софтуерен анализ на данните

Всички данни са обработени с програма BlueFuse Multi version 2.2., (BlueGnome, Cambridge). При анализа репликите на чипа се дефинират

автоматично от софтуера. Флуоресцентните интензитети на всички реплики се калкулират след автоматично елиминиране на локалния фон, като нормализацията на интензитетите на Су3 и Су5 се извършва спрямо целия набор от реплики върху чипа. Калкулира се съотношението Су3/Су5 (при тест - ДНК, белязана със Су3) и се взема средната стойност на това съотношение от репликите за всеки клон.

Критерии за отчитане на резултатите от експеримента.

При обработка на данните се генерира графика за всяка тествана ДНК, като абцисата показва хромозната позиция на хибридириралите белязани клонове, а ординатата показва логаритмичното съотношение \log_2 между интензитетите на флуоресценция на Су5 белязаните към Су3 белязаните клонове, съобразно позицията им в микрочипа. \log_2 - стойности на флуоресцентното съотношение между +0.3 и -0,3 отразяват нормален брой копия. Стойности над +0,3 са отчетени като генетични допълнения/дупликации и съответно под -0.3 като загуба (делеция).

QC (Quality control) - контрол на качеството

Софтуерът дава възможност за оценка на качеството на хибридизация, промивка и достоверност на получените резултати.

DLR raw (Derivative log Ratio raw)

Приемливите стойности за DLR raw са <0.20 . DLR е производно от \log_2 съотношението на интензитетите на флуоресценция. То отразява степента на разлика между съседни олигонуклеотидни клонове. По принцип два съседно разположени клона в повечето случаи трябва да имат много сходни съотношения, напр. ако са нормални те ще са с 1:1 съотношение. Увеличаването на стойността на DLR показва увеличаване на разликата между два съседни олиго клона.

DLR fused (Derivative log Ratio fused)

Стойностите на DLR fused трябва да са по-ниски от <0.20 . DLR fused показва съотношението на нормализираните необработени данни.

SD на автозомите

Референтни граници 0.07-0.17 SD отразява разпределението на \log_2 съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.

SBR

Референтни граници 5 - 20. Представява съотношение между силата на сигнала и фоновия шум за двете багрила поотделно.

4.4 Новогенерационно секвениране – NGS
Използвахме NGS панела за краниосиностози на лаборатория Invitae, Сан Франциско, САЩ. Този панел включва 67 от най-често срещаните генни алтерации, които се асоциират с краниостеноза. NGS скрининг се проведе при децата с клинични и параклинични белези на моногенна синдромна краниосиностоза.

При децата с генетични находки и при съгласие от родителите се проведе генеалогично уточняване и сегрегационен анализ.

Описаната последователност от специфични тестове беше методологичната основа за оценка на генетичните особености на децата с краниосиностоза. Находки на всички нива (хромозомни, микроделеционни, субмикроскопски и генни варианти) се документираха и анализираха, след което се сравниха с подобни находки от световната литература. Оцениха се наличните генотип-фенотипни корелации. Патологичните находки се изследваха на няколко нива чрез методи с различна разделителна способност. Това се извърши с цел верификация на дефекта и изследване на корелацията в резултатите от отделните генетични тестове. Непознатите на науката до момента дефекти се документираха и описаха. Определиха се кандидат гени за възможни асоциации с краниосиностоза.

V. Резултати и обсъждане

1. Клинична оценка

Синдромна краниосиностоза се установи при 96 от 99-те изследвани деца, което се равнява на 96.9%. При останалите 3 (3.1%) деца, пациенти номер 10, 17 и 90 (виж приложение 1) наблюдавахме изолирана (несиндромна) синостоза. Това разпределение е различно от установеното в литературата (виж Литературен обзор). Разликата се дължи на особеностите на децата насочени за хоспитализация в Клинична генетика. Нашите пациенти са (почти винаги) засегнати от множество малформации и дефекти, а изолирани прояви се наблюдават много рядко, защото обикновено не налагат хоспитализация. Тъй като изолираните форми на краниосиностаза също могат да се причиняват от генетични дефекти (виж Литературен обзор), при въпросните 3 деца се проведе генетичен скрининг.

Пациент номер 10 - момче на 5 години с изолирана, частична коронарна краниосиностоза, релативна макроцефалия, генерализирано разстройство на развитието и нощна енуреза. Проведените конвенционално цитогенетично изследване, MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации, и сравнителната геномна хибридизация показаха нормални резултати. Допълнително проведените - метаболитен скрининг (кръв и урина), ГаГ в урина, експанзия и премутационни състояние в *FMR1* гена – също дадоха нормални резултати (виж Приложение 1). Генетичната генеза на краниосиностозата при пациент номер 10 остава неясна и изисква допълнителни изследвания (цялостно екзомно секвениране или цялостно геномно секвениране).

Пациент номер 17 – момиче на 1 година и 3 месеца с изолирана, частична коронарна синостоза и предна плагицефалия (виж Приложение 1). Проведеният генетичен скрининг (кариотипиране, MLPA и aCGH), даде нормални резултати. ГаГ в урина и хитотриозидаза също бяха в норма. Анамнестичните данни за асистирано раждане (вакуум екстракция) и наличието на анемия водят до съмнение за генетичната етиология на краниосиностозата при този пациент. Фамилната

анамнеза разкри още: по-голям брат с епилепсия, по-голяма сестра с неуточнена анемия и два спонтанни аборта при майката (настъпили в 4-ти лунарен месец). За довършване на диагностиката при пациент номер 17 са необходими допълнителни изследвания, които предстоят.

Пациент номер 90 – момиче на 6 месеца с изолирана метопична краниосиностоза, минимален лицев дисморфизъм и нормално психо-моторно развитие (Фигура 34). Конвенционалната цитогенетика и микроделеционния анализ показаха нормални резултати. Олиго-aCGH също даде нормален резултат. Етиологията на изолираната краниосиностоза при пациент 90 остава неясна и изисква допълнителни изследвания.



Фигура 36 – Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 90 – изолирана метопична краниосиностоза (Архив на Клинична генетика)

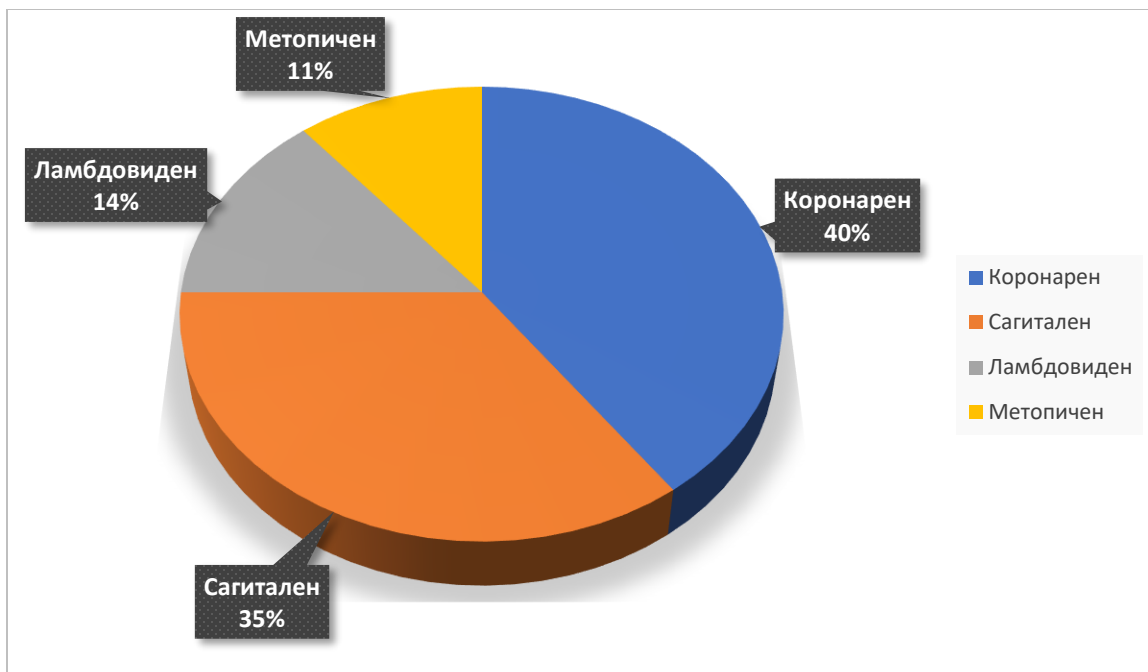
При 68 от децата (68.7%) се установи проста краниосиностоза (засягане на един от черепно-мозъчните шевове). При останалите 31 (31.3%) от децата се наблюдава комплексна синостоза (преждевременна осификация на два или повече от шевовете). Комплексните синостози се представиха като бисиностоза при 27 деца и пансиностоза (три или повече засегнати черепни сутури) при останалите 4 деца. Това разпределение може да се очаква при група от деца с предимно синдромна краниосиностоза. По-тежка клинична картина с повече усложнения се наблюдава при децата със синдромна, комплексна синостоза, особено при тези с

пансиностоза. Характеризират се с рано настъпващ и сравнително тежък кранио-фациален дисморфизъм, намален черепен обем с повишено вътречерепно налягане, пароксизмални прояви в съчетание с различни дихателни, зрителни, слухови и други увреждания.

Разпределението по анатомичен субстрат (засегнат шев) в нашата група пациенти е следното (виж фигура 35):

- коронарен при 41 деца (40%),
- сагитален при 35 деца (35%),
- ламбдовиден при 13 (13.1%) и
- метопичен шев при 10 (11%) деца.

Тези находки се доближават до официалното приетото в литературата разпределение: сагитална 40-58%, коронарна 20-29%, метопична 4-10% и ламбдовидна 2-4% [Cohen *et al.* 2000; Sarovic *et al.* 2015; Jehee *et al.* 2008; Krepischi-Santos *et al.* 2006]. Единствената съществена разлика се състои в това, че ламбдовидната синустоза се среща по-често от метопичната в нашата група. До момента липсват мащабни системни проучвания на засегнатите шевове при децата с краниостеноза в България. Причините за по-високата честота на засягане на ламбдовидния шев са неясни и изискват допълнително изследване. Възможно обяснение е недостатъчният брой изследвани деца (недостатъчен за да бъде статистически репрезентативен). Jehee и сътрудници, установяват следното разпределение: 57.8% - метопична, 17.8% коронарна, 8.9% сагитална и 15.6% комплексна краниосинустоза [Jehee *et al.* 2008]. Имайки предвид сравнително малкия брой изследвани пациенти (45 деца от Бразилия) е доста вероятно, техните резултати да са нерепрезентативни в статистически смисъл. Sarovic и сътрудници установяват различно разпределение: сагитална 40-55%, коронарна 20-30%, метопична 5-10% и ламбдовидна 1-3% [Sarovic *et al.* 2015].



Фигура 37: Разпределение на децата в нашата група според засегнатия шев

При 94 от деца се наблюдава очакваната корелация между подлежащата синостоза и проявената лицево-черепна деформация (виж Литературен обзор). При 5 от децата се наблюдава нормална форма и размери на черепа, въпреки наличната краниосиностоза. Тази необичайна находка се установи при:

- Пациент 41 - момиче на 1 година и 6 месеца, при което се установи сагитална синостоза в съчетание със скелетни аномалии, слабо изразен лицев дисморфизъм и рецидивиращи костни фрактури. Психо-моторното развитие при детето е нормално. Генетичният скрининг, състоящ се от кариотипиране и микроделеционен анализ показаха нормални резултати. Изследването на калциево-фосфорната обмяна показва завишени нива на калций и алкална фосфатаза, начална нефрокалциноза при долногранични стойности на витамин D. Проведената субституция с холекалциферол доведе до нормализиране на показателите на калциево-фосфорната обмяна и до редукция на честотата на костните фрактури.
- Пациент 42 – момиче на 9 години и 11 месеца с частична едностранна (дясна) коронарна синостоза, водеща до минимален лицев дисморфизъм при нормална конфигурация на черепа. Фамилната анамнеза показва два

- предхождащи спонтанни аборта по неуточнени причини. Проведените конвенционален хромозомен анализ и MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации показаха нормални резултати. Показателите на калциево-фосфорната обмяна също бяха в норма за възрастта. Допълнително при детето се установиха 8 фебрилно провокирани епилептични пристъпа (третирани успешно с натриев валпроат), леко изоставащо нервно-психично развитие и увреден слух. В този случай, синостозата е частична и засяга само едната половина на коронарния шев, което не може да обясни слуховото увреждане и тенденцията за пароксизмални прояви при фебрилитет. Детето подлежи на проследяване и генетична диагностика в по-голям детайл.
- Пациент 53 – момиче на 2 години и 11 месеца със синостоза на коронарния и ламбдовидния шев. От проведените изследвания (кариограма, MLPA, TMS, калциево-фосфорна обмяна) се установиха нормални резултати. Наблюдава се минимален лицев дисморфизъм при нормално физическо развитие. При детето се установиха допълнително хиперкинетично разстройство с дефицит на вниманието (ADHD), лагофталм вдясно и множество алергии.
 - Пациент 56 – момче на 1 година с коронарна краниосиностоза и нормално психо-моторно развитие. Проведеният генетичен скрининг (конвенционално кариотипиране, MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации, aCGH) не установи дефекти. Количественото изследване за мукополизахариди в урина показва горногранични стойности, а метаболитния скрининг – несигнификантни отклонения в профила на органични киселини в урина. Фамилната анамнеза разкри: по-късно проговорил баща (след 3 годишна възраст) с нефрокалциноза и майка с хронична желязо-дефицитна анемия.
 - Пациент 94 – момче на 1 година и 3 месеца, родено от трета патологично протекла бременност, с коронарна синостоза, лек лицев дисморфизъм и изоставащо психо-моторно развитие. Допълнително се установиха спонтанен, двустранен, хоризонтален нистагъм и птоза на клепачите.

Генетичния скрининг започна с кариотипиране и микроделеционен анализ, които показаха нормални резултати. Проведеният микрочипов анализ (aCGH) показва две вероятно патогенни находки (виж таблици 5 и 6): del 1q43 (747Kb) - *CHRM3*, *FMN2* и dup 22q12.3 (715Kb) - *SYN3*, *LARGE1*. Субмикроскопски терминални делеции на дългото рамо на 1-ва хромозома (del 1q43) се асоциират с: неонатална хипотония, епилептични пристъпи в ранна детска възраст, психо-моторно изоставане, затруднено хранене, нисък ръст, ВСМ, микроцефалия, хипоплазия на corpus callosum. Гените в рамките на тази делеция (715Kb) *CHRM3*, *FMN2* намират широка експресия в мозъка, но не се асоциират с краниосиностоза. Втората находка при пациент 94 е дупликация на дългото рамо на 22-ра хромозома (dup 22q12.3) с размери 715 Kb. Обхваща гените *SYN3* и *LARGE1*. Тази дупликация и патогенни варианти в гена *LARGE1* се свързват с повишен риск от развитие на разстройство от аутистичния спектър [Huang *et al.* 2017]. Дефекти в *SYN3* се асоциират със значителен риск от развитие на шизофрения в зряла възраст [Huang *et al.* 2017]. Посочените находки съвпадат частично с фенотипа на пациент 94, което обуславя нуждата от провеждане на допълнителни изследвания.

Относително запазената краниална анатомия при изброените 5 деца вероятно се дължи на частична краниосиностоза (засегнатите шевове не са осифицирани по цялото им протежение). Това позволява относително нормално развитие на черепа и мозъка, на което се дължи и нормалното психо-моторно развитие при 3 от децата. Асоциацията на краниосиностоза и правилна конфигурация на главата е необичайна находка [Moro'n *et al.* 2004]. От една страна това допълнително затруднява диагностиката, а от друга страна става причина за „случайно“ установени краниосиностози (при образно изследване на главата по друга причина).

При 73 от децата (73.8%), краниосиностозата беше доказана чрез - рентгенография на черепа (анфас и профил). Това беше стандартният, първи етап на образна диагностика, който прилагаме в изследваната група деца.

При останалите 26 (26.2%) деца, синостозата се доказва чрез провеждане на КАТ на глава.

За уточняване на състоянието се направиха допълнителни образни изследвания на ЦНС:

- при 6 (6%) деца Ядрено-Магнитен Резонанс (при пациент номер 15 - МРТ - данни за вътрешна и външна неоклузивна хидроцефалия, незавършена миелинизация; при пациент номер 22 - парциална агенезия на corpus callosum; при пациент номер 58 - вътрешна и външна хидроцефалия; дилатация на субарахноидните пространства).

- при 8 (8%) деца Транс-Фонтанелна Ехография (при пациент номер 83 - мозъчна атрофия, хидроцефалия).

Конвенционална краниография в две стандартни проекции (анфас и профил) се оказва достатъчна за откриване на синостоза при повече от 2/3 от децата. Това в комбинация със сравнително ниското радиационно натоварване, лесното приложение (не е необходима анестезия), липсата на потенциални усложнения и ниската цена, прави черепната рентгенография предпочитан метод за образна диагностика в България. Единствения сериозен недостатък остава невъзможността за визуализация на синостози, засягащи черепната база. В тези комплицирани и сравнително редки случаи се налага провеждане на компютърна-аксиална томография с 3D реконструкция на черепа [Moro'n *et al.* 2004; Badve *et al.* 2013; Khanna *et al.* 2011; Itoh *et al.* 2006; Sargar *et el.* 2017]. Към момента, в развитите страни, КАТ е златният стандарт за диагностика на краниосиностоза.

Всички деца бяха оценени от педиатър и дисморфолог. Установи се широка палитра от кранио-фациални дисморфични стигми, които се оказаха една от първичните индикации за хоспитализация, както и база за диагностичния процес. Основните дисморфични стигми бяха:

- проминиращи черепно-мозъчни шевове – при 67 деца (69%);
- преждевременно затворена Брегма – при 66 деца (67.5%);
- микроцефалия – при 55 деца (57.3 %)
- лицева асиметрия – при 47 деца (48.45%);

- проминиращи тубери при 43 деца (43.3%);
- хипертелоризъм – при 37 деца (38.1%);
- псевдоекзофталм – при 31 деца (31.9%);
- хипотелоризъм – при 29 деца (29.8%);
- проптоза – при 21 деца (21.6%);
- асиметрично поставени ушни миди – при 15 деца (15.46%);
- среднолицева ретракция – при 11 деца (11.3%).

**Сборът от посочените проценти значително надхвърля 100, поради факта, че при децата се наблюдаваха комбинации посочените дисморфични стигми.*

Проминиращите черепно-мозъчни шевове, рано затворена голяма фонтанела и микроцефалия се очертаха като най-често срещаните дисморфични стигми. Установяването им е въпрос на изчерпателен физикален преглед и не изисква опит и знания в областта на дисморфологията, и клиничната генетика. Ранното откриване на тези белези (всяка комбинация от трите) води до ранно поставяне на диагнозата – краниосиностоза, което от основно значение за оптимизиране на терапевтични подход.

При 34 от децата (34.3%) краниосиностозата се асоциира с тежки аномалии и функционални нарушения на ЦНС.

- При 7 (7.07%) деца се установиха различни форми на ДЦП, което корелира с усложнената им перинатална анамнеза и тежкото психомоторно изоставане. В повечето случаи ДЦП се асоциира с екзогенна краниосиностоза. Значително по-рядко се установява комбинация от ДЦП и синдромна синостоза, което се наблюдава при нашите пациенти. Възможно е перипарталната хипоксия на ЦНС, която е задължителен етиологичен фактор при ДЦП, да допринесе за увреждането на мозъка и неговите обвивки. Хипотетичната етиопатогенетична връзка между тези състояния остава неясна и изисква насочено изследване. Agoshukwu и сътрудници предлагат хипотезата, че хипоксемията може да провокира свръхекспресия на определени гени, като *FGFR3*. Което от своя страна

може да причини преждевременна осификация на калварията [Agochukwu *et al.* 2012]

- При 16 деца (16.1%) се установиха различни пароксизмални прояви, вариращи от единични генерализирани тонично-клонични гърчове до тежка рефрактерна епилепсия. Средната възраст на дебют на епилептичните пристъпи в нашата група деца е 2 години. Всички деца с епилептични нарушения се проследяват от детски невролог, а 13 от тях провеждат антиконвулсивна терапия. Останалите 3 деца се претърпяха своевременно неврохирургична интервенция, което доведе до купиране на пароксизмалните им прояви. Асоциацията между краниостеноза и епилепсия е позната, но неуточнена [Chang *et al.* 2003]. Счита се, че първичното нарушение е стенозата на черепа, която води до повишено вътречерепно налягане и компресия на определени части от главния мозък. Това нарушава интимните механизми на „комуникация“ съществуващи между мозъка, неговите обвивки и краниалните кости. Допълнително, компресията, може да опорочи естествения дренаж на цереброспинална течност. В следствие на първичното механично нарушение се развиват вторични епилептични прояви (симптоматична епилепсия, която често е рефрактерна на конвенционалната антиконвулсивна терапия). Добри резултати се постигат чрез навременна неврохирургична интервенция, която води до декомпресия на коровите структури и много често, до преодоляване на епилептичните пристъпи. Възможността за оперативна корекция, зависи от възрастта при поставяне на диагнозата (оптимални резултати се постигат при деца оперирани до 12-13 месечна възраст [Lin *et al.* 2015; Ardalan *et al.* 2015; Abu-Sittah *et al.* 2016; Taylor *et al.* 2001]), патоанатомичните особености на черепа и наличието на допълнителни симптоми при детето. Това обяснява критичната нужда от навременна диагноза на краниосиностотичните състояния (генетични и негенетични). Неврохирургичните резултати (виж Литературен обзор) са отлични и са единствената ефективна форма на терапия при клинично значимите

краниални деформации. През юли 2022, Stanbouly, Radley и сътрудници, публикуват резултатите си от мащабно ретроспективно проучване при деца с комбинация от краниосиностоza и следните допълнителни фактори: обструктивна сънна апнея, хидроцефалия, повишен вътречерепен натиск. Включени са 4709 деца, от които 244 (5.2%) проявяват епилепсия. Средната възраст на дебют на епилептичните пристъпи е 1.4 години. Епилепсия се развива при 66% от децата с повишено интракраниално налягане, при 24% от децата с хидроцефалия и 30% от децата с обструктивна сънна апнея [Stanbouly et al. 2022]. Тези резултати доказват ролята на описаните фактори за развитието на епилепсия при деца с краниосиностоza. Agochukwu и сътрудници, изследват връзката между синдрома на Muenke (моногенна краниосиностоza) и епилепсия [Agochukwu et al. 2012]. От избраните 58 деца, 7 (12%) развиват епилепсия. Освен познатите фактори (повишен вътречерепен натиск, механична компресия на участъци от мозъчната кора) авторите изтъкват ролята на активиращите мутации на *FGFR3* гена и неговата свръхекспресия като допълнителен епилептогенен фактор [Agochukwu et al. 2012].

- При 11 деца (11.1%) се установиха поведенчески аномалии от аутистичния спектър (ASD): изолиран дефицит на експресивната реч, хиперактивно поведение с дефицит на вниманието и детски аутизъм. Патогенетичната връзка между поведенческите отклонения и краниосиностоzата е позната, но все още неуточнена. Предполага се, че краниостенозата води до повишен вътречерепен натиск, който води до поведенчески аномалии. Най-вероятно механизма свързващ тези състояния е по-сложен, тъй като поведенческите аномалии от аутистичния спектър не се купират напълно след успешна неврохирургична корекция на черепния дефект. Засегнатите деца се проследяват от детски психиатър, логопед и клиничен психолог. Junaid и сътрудници, изследват асоциацията между различни краниални малформации (включително краниосиностоza) и развитието на детски

аутизъм. Авторите установяват, че от изследваните 239 деца с краниосиностоза, приблизително 28% развиват различни форми на детски аутизъм [Junaid *et al.* 2022]. Това потвърждава очакваната асоциация между тези състояния. Екип от психолози, психиатри и генетици, ръководени от Kathleen Kapp-Simon провеждат изследване на поведенческите особености при 232 деца с проста (моносутурална) краниосиностоза и ги сравняват с контролна група от 235 деца без краниални дефекти [Kapp-Simon *et al.* 2012]. Поведенческите аномалии при децата са определени и систематизирани чрез психиатрично обследване и въпросник (попълван от родителите на 19 и 37-месечна възраст). Резултатите показват минимални (статистически незначими) разлики в процента на поведенчески аномалии между двете групи деца (25% от децата със синостоза и 22% от децата без краниален дефект). Все пак поведенческите аномалии от аутистичния спектър са по-чести в групата на децата с краниосиностоза [Kapp-Simon *et al.* 2012].

При децата със синдромна краниосиностоза (96.9% от изследваните) се установи значително разнообразие от допълнителни симптоми и увреждания, които засягат практически всички органи и системи [Hibberd *et al.* 2016]. По-често срещаните са систематизирани в Таблица 4.

Пациент номер	Засегнатата система	Находка и симптоми
3	ГИТ, ОДА	Ингивнална херния, умбиликална херния, страбизъм, хипоспадия
6	ССС	Междупредсърден дефект с малък Л-Д шънт; отворен ФО
11	ССС	Междупредсърден дефект тип secundum
15	Очи	Зрителни нарушения
17	-	Анемия (неуточнена)

18	ГИТ	Газове, флатуленция, несмлени хранителни частици във фецес
20	ОС	Левостранна хидронефроза II-ра степен
29	-	Анемия (желязо-дефицитна)
31	ССС	Тежка комбинирана ВСМ със СН
33	ОС	Ренална мултикистоза в дясно
34	Очи, ЦНС	Точковидна катаракта на ляво око, калцификати в гл. мозък
35	ОС	Анемия (неуточнена) и ренални аномалии
36	ОДА	Торако-лумбална кифоза
40	ССС	Надклапна пулмонална стеноза и периферни стенози на двата клона на БА
44	Очи	Хордеолум, кератит и ектропион
45	ССС	Тетралогия на Фало
46	ИС	Комбиниран имунен дефицит
54	ССС	Двустранна невросензорна глухота, ВСМ
55	ОДА	Торакална кифоза и лявоконвексна лумбална сколиоза
60	ОС	Вродена бъбречна аномалия (подковообразен бъбрек); съмнение на глухота
61	ОС	Хидронефроза 1-2 степен на ляв бъбрек
63	-	Анемия (неуточнена)
65	ССС	ВСМ – МКД
74	ССС	Надклапна стеноза на БА
75	Очи	Конвергиращ страбизъм с хиперметропия (+2.5)
82	ССС	Митрална инсуфициенция
84	ССС, ГИТ	Малка предсърдна комуникация тип ФО, ТИ I-II ст., хепатомегалия
85	ОДА, СССР	Полупрешлен Th6 и spina bifida на ниво Th5 – Th7; ЕхоКГ – персиситраци фет. Комуникации
91	-	Екзофталм, четирипръстна бразда на лява ръка
92	ОДА	Rectus excavatum, ставен хиперфлексibilitет
93	ПС, Очи	Незавършен тестиуларен десцензус в дясно, страбизъм на ляво око
94	Очи	Хоризонтален нистагъм, птоза на клепачите
95	-	Диастаза на правия коремен мускул, умбиликална и ингвинална херния

Таблица 4 – Допълнителни находки в групата на деца със синдромна краниосиностоза.

Фамилната анамнеза при изследваните деца, даде голямо разнообразие от данни. Снемането на генеалогична информация беше невъзможно при 33 деца

(33.3%), поради липса на контакт с биологичните им родители (деца от социални заведения, адоптирани). При останалите 64 деца (64.6%) фамилната анамнеза показва:

- близкородствен брак в семействата на 6 от децата. Косангвинитетът (генетична връзка между индивиди, които са потомци на поне един общ прародител) е позната причина за повишен риск от възникване на автозомно-рецесивни заболявания. Честотата му при родителите на нашите пациенти е 6%. Клинично значими находки се установиха при 2 (пациент 24 и 32) от тези 6 деца.

- при пациент номер 24 (момиче на 2 години и 3 месеца) се установи сагитална краниосиностоза с долихомакроцефална конфигурация на главата при нормално физическо и нервно-психично развитие. Допълнително се наблюдаваха – макроглия, хиперпигментни петна по тялото и тесни слухови канали. Детето боледува често от остри респираторни инфекции, от около 1-годишна възраст е регистрирана лекостепенна хепато-спленомегалия. Поради сънна апнея, детето спи със спомагателен апарат (CPAP). Фамилната анамнеза разкри следното: майка с бронхиална астма и Хепатит В; син на сестрата на майката (първи братовчед) с болест на Sanfilippo В. Конвенционалното цитогенетично изследване показва нормален женски кариотип – 46,XX. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации също даде нормален резултат. Количественото изследване на мукополизахариди в урина даде патологични стойност - 100.27 mg/mmol Cr, при норма за възрастта от 5.4 до 14.2 mg/mmol Cr. На следващ етап се проведе качествен анализ на мукополизахариди в урина и ензимен анализ, които показаха констелация характерна за мукополизахаридоза тип III В (болест на Sanfilippo). Детето се проследява. Дадоха се препоръки в семейството да се направи генетичен анализ, поради риска от повторения на заболяването при следваща бременност. В литературната справка не установихме данни за асоциация на краниосиностоза и синдрома на Sanfilippo - за разлика от повечето мукополизахаридози, където

краниосиностозата присъства като ранен и усложняващ прогнозата фактор [Oussoren *et al.* 2018].

- пациент 32 – момче на 7 месеца с коронарна краниосиностоза, неспецифичен дисморфизъм (предимно лицево-черепен), ранна и неравномерна осификация на париеталните кости и ризомиелично скъсяване на горни крайници. Допълнително се установи тежко изоставащо физическо, при нормално нервно-психично развитие (IQ=85). Фамилната анамнеза разкри близкородствен брак – родителите на детето са първи братовчеди. Генетичния скрининг установи: нормален мъжки кариотип – 46, XY; нормален резултат от MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации; вероятно бенигна делеция на късото рамо на 2-ра хромозома - del 2p22.3 (50.89Kb) /2/ и бенигна дупликация на дългото рамо на 17-та хромозома dup 17q21.31 (346.85Kb) /1/. Тези находки не предизвикват патологични изменения и не могат да обяснят клиничната картина при пациента. При изследване на плазменото ниво на амоняк се установи патологично висок резултат - 148 $\mu\text{mol/l}$ при норма за възрастта до 11-32 $\mu\text{mol/l}$. Резултатите от метаболитен скрининг (аминокиселини в кръв, ацилкарнитини в кръв, органични киселини в урина) бяха нормални. Хиперамонемията е характерна находка при някои от вродените грешки на обмяната – дефектите на урейния цикъл (ДУЦ), част от органичните ацидемии (пропионова, метилмалонова, изовалерианова) и при дефицит на карбоанхидраза тип VA [Ah Mew *et al.* 2022]. Други възможни причини са: тежки увреждания на черния дроб (метаболитни, инфекциозни, автоимунни, цироза,), остра бъбречна недостатъчност и крайните стадии на хронично бъбречно увреждане. Хиперамониемия може да се наблюдава и като нежелана лекарствена реакция при терапия с натриев валпроат и циклофосфамид. Проведените до момента изследвания при нашия пациент не установиха етиологията на хиперамониемията. Емпирично се започна терапия с Натриев фенилбутират. Това е предлекарство, което се метаболизира до фенилацетилглутамин. На

моларна основа фенилацетилглутаминът е сравним с уреята (и двете съединения съдържат по 2 мола азот) и затова осигурява алтернативен път за екскрецията на отпадъчния азот. Като следствие, натриевият фенилбутират намалява повишените плазмени нива на амоняка и глутамин. В резултат на тази терапия, нивата на амоняк при нашия пациент се редуцираха до 57/68 $\mu\text{mol/l}$. Препоръча се диета с рестрикция на протеиновия прием. Пациентът не е постъпвал за контрол на състоянието в Клинична генетика от 2017-та година. Литературната справка не установи причинно-следствени връзки между хиперамониемия и краниосиностоза. Пациента подлежи на допълнителни изследвания.

Близкородственият брак е известен, негативен фактор (в генетично отношение) и би трябвало да се избягва, ако е възможно. Превенцията на подобни практики е част от съветите за семейно планиране в рамките на медико-генетичната консултация.

- предхождащи аборти и мъртвородени сиблинги се установиха в семействата на 12 от децата (12.12%) – Таблица 5.

Пациент номер	Краниосиностоза	Находка
17	коронарна	-
18	ламбдовидна	dup 4q13.1 (624.66 Kb) /3/
33	лява коронарна и сагитална	-
42	дясна коронарна	-
47	коронарна и сагитална	-
50	ламбдовидна	-
52	метопична	-
62	едностранна коронарна	47,XY,+mar (de novo); дупликация 14p (PARP2)
71	коронарна и ламбодивна	-
72	сагитална	-

86	коронарна и метопична	-
95	ламбдовидна	-

Таблица 5: Пациенти с доказана краниосиностоза и анамнеза за предхождащи абрти и мъртвородени деца в семейството, със съответната генетична находка.

- пациент номер 18 е момче на 4 години и 8 месеца, с неспецифичен лицево-черепен дисморфизъм и частична ламбдовидна краниосиностоза. Детето се презентира с леко изоставащо нервно-психично и физическо развитие, данни за генерализирано разстройство на развитието, флатуленция и несмлени хранителни частици във фецес. Освен предхождащия аборт, фамилната анамнеза разкри още: баща с хроничен гастрит; майка с дискалкулия, ADHD, птоза на десен бъбрек и уролитиаза. От проведените изследвания: метаболитен скрининг (кръв и урина), ГАГ в урина, експанзия и премутационни състояния в *FMR1*, изследване за мутации в митохондриална ДНК – се установиха нормални резултати. Допълнително се установи лекостепенна хиповитаминоза D, която се коригира с перорална субституция. Конвенционалната цитогенетика показва нормален мъжки кариотип, а MLPA за микроделеции, субтеломени делеции и дупликации също даде нормален резултат. Проведената сравнителна геномна хибридизация установи наличието на дупликация на дългото рамо на 4-та хромозома (dup 4q13.1) с размери 624.66 Kb, от клас 3 (вариант с неясно клинично значение). Родителите отказваха сегрегационен анализ. През 2013-та година, Matoso и сътрудници описват клиничен случай на брат и сестра (на 5 и на 8 години, съответно) с дефицит на експресивната реч и ADHD, които носят дупликации в същия локус - dup 4q13.1 [Matoso *et al.* 2013]. Размерът на аберацията е 8.7 MB, включва 50 RefSeq гена, сред които е *EPHA5*. Този ген играе роля в ранните етапи на изграждане на синаптичните връзки, обема на паметта и продължителността на концентрацията [Matoso *et al.* 2013]. Същата дупликация е установена при майката (която проявява речеви дефицит, трудна концентрация и намалена памет), а при бащата не са установени

- генетични промени. При децата се установява лек и неспецифичен лицев дисморфизъм (издължено лице, ниско поставени и големи ушни миди), краниосиностоза не е описана. Разликите между описаният случай на деца с дупликация 4q13 и нашият пациент номер 18 се състоят в: размерите на дефекта (в нашият случай, дупликацията е значително по-малка), липсата на краниосиностоза при сиблингите и невъзможността за сегрегационен анализ при родителите на нашия пациент. На базата на това, за момента считаме пациент 18 за неуточнен. Необходимо е провеждането на FISH или MLPA (за потвърждаване на дефекта на 4-та хромозома) и сегрегационен анализ (майка с ADHD и предхождащ аборт).
- при пациент номер 62 се установи: 47,XY,+mar de novo – патологичен, небалансиран мъжки кариотип с допълнителна маркерна хромозома с размери и структура подобни на малък акроцентрик. Детето се презентира с унилатерална коронарна синостоза и съответната плагицефалия. Установиха се и кранио-фациален дисморфизъм, микропенис, по широки палци на ръцете и краката, дефицит на експресивната реч, мускулна хипотония на горни крайници. Фамилната анамнеза установи, предхождаща бременност завършила със спонтанен аборт. Кариограми на родителите – в норма. При детето се проведе и микроделеционен анализ с резултат: dup14p (*PARP2*) дупликация на дългото рамо на 14-та хромозома, съдържаща гена *PARP2*, което обяснява маркерната хромозома в кариотипа. Посоченият ген не се експресира в костната тъкан и до момента няма асоциации с възникване на краниосиностоза. Все още нямаме възможност за провеждане на aCGH, което би уточнило размерите и характера на генетичния дефект при пациента.

Генетична находка при нашите пациенти с краниосиностоза, от семейства с предхождащи аборти и рано починали сиблинги, се установи само при 2 деца.

Сред по-честите причини за спонтанни аборти и мъртвородени деца са хромозмните аберации и метаболитните болести, които могат да се асоциират и с

краниосиностоza (виж. Литературен обзор). Такива дефекти не се установиха при останалите 10 деца.

2. Показатели на калциево-фосфорната обмяна

При 97 (97.9%) от изследваните деца, показателите на калциево-фосфорната обмяна, бяха в границите на нормата за възрастта. Само при две деца установихме клинично значими отклонения:

При пациент 35 (момче на 1 година и 8 месеца) се установи лабораторна констелация, характерна за рахит; коронарна краниосиностоza и кореспондиращ лицево-черепен дисморфизъм (Фигура 36); допълнителни скелетни аномалии (пошироки дистални фаланги на палците на долни крайници); изоставащо физическо при нормално нервно-психично развитие; патологична бременност, ниско тегло при раждането и тежък ранен неонатален период (престой в кувьоз, кислородотерапия, изкуствена белодробна вентилация, антибиотично лечение); в хода на проследяването при детето се установи желязо-дефицитна анемия и структурни аномалии на бъбреците. Проведе се субституираща терапия с витамин D и желязен препарат с много добри резултати. Конвенционалната цитогенетика установи парацентрична инверсия на 9-та хромозома - 46,XY,inv9(q13;p11). Посочената аберация не е описвана до момента във връзка с краниосиностоza. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации даде нормален резултат. Микрочиповият анализ (aCGH) показва: субмикроскопска дупликация на късото рамо на 1-ва хромозома - dup 1p22.1 с размер 378.47 Kb от клас 3 – вариант с неясно клинично значение. В посоченият хромозомен участък се намират следните гени: *TGFBR3*, *BRDT*, *EPHX4*, *BTBD8*, *KIAA1107*, *C1orf146*. Сред тях само *TGFBR3* се свързва с регулацията на черепно-мозъчните шевове. Генът кодира протеина - *transforming growth factor* (TGF)-beta тип 3 рецептор. Тези рецептори, заедно със рецепторите за фибробластните растежни фактори са широко експресирани в косните клетки и костния матрикс и играят основна роля при преждевременната осификация на черепните сутури [Sundaresan *et al.* 2019]. Дупликацията на този ген би могла да доведе до синостоza на краниалните шевове, което обяснява

находката при нашия пациент. Хромозомния локус 1p22.1 е потенциален кандидат за допълнителни изследвания във връзка с възникване на синдромна краниосиностоза.



Фигура 38: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 35 (Архив на Клинична генетика)

При пациент 41 се установи сагитална краниосиностоза, нормално психомоторно развитие, тенденция за фрактури на крайниците, завишени нива на калций и алкална фосфатаза, ниски нива на витамин D и начална нефрокалциноза (виж по-горе). Генетичният скрининг, състоящ се от кариотипиране и микроделеционен анализ показва нормални резултати.

Отклонения в калциево-фосфорния метаболизъм са характерни за негенетичната краниосиностоза. Фактът, че 97.9 % от децата в нашата група са с генетична (синдромна) краниосиностоза, обяснява и съответно високия процент на деца с нормални параметри на калцево-фосфорната обмяна. Установените отклонения при пациент 35 и 41 вероятно допринасят за лицево-черепния дисморфизъм и придружаващите скелетни аномалии. Въпреки това, считаме тези лабораторни стойности за инцидентни, тъй като дисморфичните и генетични находки доказват синдромния характер на краниосиностозата при тези деца. Оценката на калциево-фосфорната обмяна остава задължителна при пациенти с краниални (и/или други скелетни) деформации, тъй като отклоненията в този аспект са много по-чести в сравнение с генетичните дефекти.

3. Генетичен скрининг

3.1 Конвенционално кариотипиране

Проведе се при всички 99 деца, като първа и задължителна стъпка от генетичния скрининг.

Хромозомни аберации се установиха при 12 или 12.12% от изследваните деца. Този резултат се доближава до минималната съобщената честота в световната литература, а именно от 14 до 16 % (по-рядко до 25 %). Jehee и сътрудници, установяват хромозомни аберации при 9 от 45 изследвани деца с краниосиностоза. Това се равнявана приблизително 20% от случаите [Jehee *et al.* 2008]. През 2010 година, в група от 236 деца, претърпели неврохирургична интервенция поради краниосиностоза, Wilkie и сътрудници установяват честота на хромозомни аберации – 14% [Wilkie *et al.* 2010]. Lattanzi и сътрудници, публикуват резултатите от голямо проучване в литературата, при което установяват честота на хромозомни аберации при деца с краниосиностоза в около 20-25% от случаите [Lattanzi *et al.* 2012]. През 2011-та година, Passos-Bueno и екип от клинични генетици, провеждат друго мащабно проучване в литературата и установяват честотата на хромозомните аберации при деца с краниосиностоза – 16% [Passos-Bueno *et al.* 2011]. Това доказва значението на хромозомния анализ при пациенти със синдромна краниосиностоза. В таблица 6 са обобщени находките от хромозомния анализ при нашите пациенти.

Пациент No:	Хромозомна аберация
5	46 X, t(Y;12)(q12;q14)
31	46, XX, del(18)(q22.2)
34	46,XX,der (21)t(15;21)(q23;q22.2)mat
35	46,XY, inv9(q13;p11)
36	46,XY,add(14)(p12)
43	47,XX,+mar[2]/46,XX[30]
44	47,XX, + 21
46	46,XX с много несистемни преустройства

62	47,XY,+ mar (de novo)
68	46,XX,t(2;7)(q14;q35)
84	47,XY, + 21
92	47,XY, + mar

Таблица 6: Находки от конвенционална цитогенетика при изследваната група деца с краниосиностоза.

Както е видно от Таблица 6 цитогенетичните находки са разнообразни и несистемни. Не се установяват корелации между определена хромозомна аберация и определен тип краниосиностоза.

- При пациент номер 5 се установи транслокация между 12-та и У-хромозомата асоциирана с коронарна краниосиностоза, тежко психомоторно изоставане, ДЦП, рефрактерна епилепсия и генерализирана мускулна хипотония в неонаталния период. Литературната справка не установи асоциации между 46 X, t(Y;12)(q12;q14) и краниосиностоза. Тази хромозомна аберация е изключително рядко срещана и сравнително слабо изучена. Няма установени генотипно-фенотипни корелации поради минималния брой верифицирани случаи. Микроделеционния анализ (MLPA) при пациент номер 5 показва нормален резултат, което се обяснява с естествените ограничения на метода (виж Методи и материали и Литературен обзор). Необходимо е да се проведе и микрочипов анализ (aCGH), за да се потвърди и уточни цитогенетичната находка при пациента.
- При пациент номер 31 (3 годишно момиче с ламбдовидна краниосиностоза) се установи делеция на дългото рамо на 18-та хромозома - 46, XX, del(18)(q22.2). MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации потвърди находката - del 18q (*CTDP1, FLJ21172*). Дефекти в посочените гени не се асоциират с краниосиностоза. Допълнително при пациента се установиха: микроцефалия, краниофациален дисморфизъм, тораколумбална кифосколиоза, радиална хемимелия с двустранна аплазия на радиусите и палците, луксация на лява лакътна става и междупредсърден дефект. Детето е също така с

изоставащо психо-моторно развитие и генерализирана мускулна хипотония. В литературата не се откриха асоциации между тази делеция и краниосиностоза. Пациента подлежи на микрочипов анализа за завършване на генетичното уточняване.

- При пациент номер 34 се установи сложна цитогенетична находка с майчин произход, състояща се от дериватна хромозома 21 в следствие на реципрочна транслокация между хромозома 21 и 15 - 46,XX,der (21)t(15;21)(q23;q22.2)mat. Скринингът продължи с микроделенионен анализ, който демонстрира нормален резултат. За съжаление към момента не сме получили възможност да проведем и сравнителна геномна хибридизация (aCGH). Клинично детето се представи с метопична синостоза, тригоноцефалия, точковидна катаракта на ляво око и калцификати в главен мозък. Сегрегационния анализ показва, че майката е носител на балансирана транслокация - 46,XX, t(15;21)(q23;q22.2). Не открихме асоциации между транслокация 15;21 и краниосиностоза. За финализиране на генетичния скрининг е необходимо да се проведе и aCGH.
- При пациент номер 35 (момче на 1 година и 8 месеца с коронарна синостоза) се установи парацентрична инверсия на 9-та хромозома - 46,XY,inv9(q13;p11). Посочената аберация не е описвана до момента във връзка с краниосиностоза. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации даде нормален резултат. Микрочиповият анализ (aCGH) показва: субмикроскопска дупликация на късото рамо на 1-ва хромозома - dup 1p22.1 с размер 378.47 Kb от клас 3 – вариант с неясно клинично значение. В посоченият хромозомен участък се намират следните гени: *TGFBR3*, *BRDT*, *EPHX4*, *BTBD8*, *KIAA1107*, *C1orf146*. Сред тях само *TGFBR3* се свързва с регулацията на черепно-мозъчните шевове. Генът кодира протеина - *transforming growth factor* (TGF)-beta тип 3 рецептор. Тези рецептори, заедно със рецепторите за фибробластните растежни фактори са широко експресирани в косните клетки и костния матрикс и играят основна роля при преждевременната осификация на

- черепните сутури [Hunenko *et al.* 2001]. Дупликацията на този ген би могла да доведе до синостоза на краниалните шевове, което обяснява находката при нашия пациент. Хромозомния локус 1p22.1 е потенциален кандидат за допълнителни изследвания във връзка с възникване на синдромна краниосиностоза.
- Пациент номер 36 е момче на 1 година и 2 месеца с комплексна краниосиностоза (метопична и ламбдовидна), тригоноцефалия, изоставащо психомоторно развитие и фамилна анамнеза обременена за епилепсия (майка и по-голяма сестра). Конвенционалното кариотипиране показва следната находка - 46,XY,add(14)(p12) – мъжки кариотип с допълнителен материал към късото рамо на 14-та хромозома. Втората стъпка от генетичния скрининг – микроделеционен анализ – показва източника на този допълнителен материал, а именно микродупликация на късото рамо на 7-ма хромозома - dup 7p – съдържаща следните генни секвенции: *SUN1* и *ADAP1*. Литературната справка не установи асоциации с краниосиностоза. Необходимо е провеждане на сравнителна геномна хибридизация за уточняване на находката при пациент 36.
 - При пациент номер 43 (момиче на 2 години и 6 месеца) се установи коронарна краниосиностоза, микроцефалия и тежко психомоторно изоставане - IQ=10. Освен неспецифичния кранио-фациален дисморфизъм се наблюдава и хейлогнатопалатосхизис. Хромозомния анализ показва - 47,XX,+mar[2]/46,XX[30] – нискостепенен мозаицизъм с неуточнена маркерна хромозома. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации даде нормален резултат. Детето живее в ДМСГД, поради което липсва информация относно фамилната анамнеза. За генетичното уточняване на пациента е необходимо да се проведе aCGH.
 - Пациент номер 44 се презентира с коронарна синостоза, микроцефалия и типични дисморфични стигми за синдром на Даун. Диагнозата се потвърди чрез конвенционално цитогенетично изследване - 47,XX+21 – патологичен небалансиран, женски кариотип с тризомия 21 – регулярна форма на Даун синдром. Асоциацията между различни форми на

- краниосиносто́за и синдро́ма на Даун е известна, но рядко срещана и неуточнена (виж Литературен обзор). През 2014 година Siu и сътрудници описват две новородени деца с тризомия 21 и едностранна (дясна) коронарна краниосиносто́за. Клиничната им презентация е характерна за синдро́ма на Даун. Двете деца претърпяват неврохирургични интервенции поради повишен вътречерепен натиск - при първото дете е избран билатерален фронтно-орбитален авансмант, а при второто – ендоскопски асистирана стрип-краниотомия с постперативен коригиращ шлем. Оперативните резултати при двете деца са отлични [Siu *et al.* 2014].
- Сходна находка се установи при пациент 84 - 47,XY + 21 – момче на 4 години типични стигми за синдром на Даун в комбинация с брахицефална конфигурация на главата и бисиносто́за засягаща коронарния и сагиталния шев. Допълнително при детето се установиха: малка предсърдна комуникация тип foramen ovale, трикуспидална инсуфициенция I-II степен и хепатомегалия.
 - Пациент 46 се презентира със сагитална краниосиносто́за, микроцефалия, наклонено чело, микроретрогнатия, ниско разположени ушни миди и комбиниран имунен дефицит. Кариограмата показва женски кариотип с множество несистемни хромозомни преустройства (виж Таблица 3). Микроделеционният анализ показва нормален резултат. Описаната констелацията е характерна за Nijmegen Breakage синдром, което се потвърди чрез таргетно секвениране на отговорния ген – NBS - хомозиготна мутация 657del5. Цитогенетичният анализ при родителите показва наличие на несистемни хромозомни реорганизации, изразени в по-слаба степен. Асоциацията между NBS и краниосиносто́за е много рядка и нетипична находка. Seemanova и сътрудници описват случай на хетерозиготни близнаци, при които е забелязана интраутеринна микроцефалия и абнормна форма на черепите в 31-ва гестационна седмица. След раждането се установява наличието на дисморфични стигми и комплексна краниосиносто́за (коронарна и сагитална) у двете деца, но изразени в различна степен. Поради наличието на вродена

микроцефалия е проведен скрининг за Nijmegen Breakage синдром (стандартна практика в Чехия и Словакия, поради по-високата честота на заболяването в тези популации). Най-честата мутация 657del5 се установява при сиблингите, което доказва диагнозата. Краниосиностозата при първия близък е по-силно изразена, което я прави обект на неврохирургична корекция [Seemanova et al. 2019]. Корелацията между синдрома на Nijmegen Breakage и краниостенозата остава неясна и изисква допълнителни изследвания.

- При пациент номер 62 се установи: 47,XY,+mar de novo – патологичен, небалансиран мъжки кариотип с допълнителна маркерна хромозома с размери и структура подобни на малък акроцентрик. Детето се презентира с унилатерална коронарна синостоza и съответната плагицефалия. Установиха се и кранио-фациален дисморфизъм, микропенис, по широки палци на ръцете и краката, дефицит на експресивната реч, мускулна хипотония на горни крайници. Фамилната анамнеза установи, предхождаща бременност завършила със спонтанен аборт. Кариограми на родителите – в норма. При детето се проведе и микроделеционен анализ с резултат: dup14p (*PARP2*) дупликация на дългото рамо на 14-та хромозома, съдържаща гена *PARP2*, което обяснява маркерната хромозома в кариотипа. Посоченият ген не се експресира в костната тъкан и до момента няма асоциации с възникване на краниосиностоza. Все още нямаме възможност за провеждане на aCGH, което би уточнило размерите и характера на генетичния дефект при пациента.
- При пациент номер 68 се установи патологичен женски кариотип 46,XX,t(2;7)(q14;q35) – транслокация между дългите рамена на хромозома 2 и 7. Идентична транслокация се установи при майката на пациента, която манифестира лек лицев дисморфизъм. При бащата се установи нормален мъжки кариотип. MLPA показва микродупликация на късото рамо на втора хромозома - dup 2p16.1. В литературата са описани няколко случая на *de novo* възникнали, интерстициални микродупликации

включващи региона 2p16.1-p15. Описаните случаи се характеризират с лицев дисморфизъм, забавено психо-моторно развитие, вродени сърдечни малформации и разнообразни допълнителни и неспецифични дисморфични стигми [Lovrecic et al. 2018]. Не се установиха асоциации с краниосиностоза. Финалната стъпка от генетичния скрининг беше сравнителна геномна хибридизация, която установи патогенна дупликация на късото рамо на хромозома 2 - dup 2p22-3p16.1 (25.19 Mb). Този хромозомен регион е със значителни размери и обхваща множество гени, които се оказаха неасоциирани с краниосиностоза с едно изключение - гена *SIX2* (виж Таблица 6). Този ген кодира специфичен транскрипционен фактор, отговорен за процесите на клетъчна диференциация и миграция. Това е от основно значение за развитието на много тъкани и органи, включително на черепа. Повишеният генен дозаж на *SIX2* може да доведе до ранна и изразена осификация на краниалните шевове, което обяснява находката при нашия пациент (ламбдовидна краниосиностоза). Hufnagel и сътрудници представят клиничен случай с фронтоназална дисплазия и сагитална краниосиностоза, в следствие на микроделеция на *SIX2* гена [Hufnagel et al. 2016]. Тези находки потвърждават комплексната роля на *SIX2* в етио-патогенезата на синдромната краниосиностоза, което го прави и кандидат за допълнителни и насочени изследвания.

- Пациент номер 92 е момче на 7 години с ламбдовидна краниосиностоза и задна плагицефалия, лицев дисморфизъм (Фиг. 37), генерализирано разстройство на развитието, митрална и аортна инсуфициенция, *pectus excavatum*, ставен хиперфлексибилитет, мускулна хипотония и тежко изоставащо нервно-психично развитие. Конвенционалното цитогенетично изследване показва 47,XУ,+*mar* – небалансиран мъжки кариотип с маркерна хромозма с неидентифициран произход. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации показва нормален резултат. Проведената aCGH установи: дупликация на дългото рамо на 15-та хромозома - dup 15q11.2q13.1 (6.26 Mb). Това доказва диагнозата –

15q микродупликационен синдром – състояние, характеризиращо се с хипотония, психо-моторно изоставане, интелектуален дефицит, поведенчески отклонения от аутистичния спектър, епилепсия и по-рядко с психоза [Lusk *et al.* 2021]. Описаният синдром се припокрива частично с находката при нашия пациент номер 92. До колкото ни е известно това е първата описана асоциация между 15q микродупликационен синдром и краниосиностоза. Тази находка потвърждава фенотипната вариабилност на синдрома от една страна, а от друга страна доказва за пореден път генетичната хетерогенност на синдромната краниосиностоза. Този клиничен случай обогатява фенотипния спектър на 15q микродупликационния синдром и допринася за установяване на генотипно-фенотипни корелации.



Фигура 39 – Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 92 - 15q микродупликационен синдром (Архив на Клинична генетика)

3.2 MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации

Проведе се при 97 деца, като втора и задължителна стъпка от генетичния скрининг. Патологични находки се установиха при 10 от децата – 10.1%. Този процент е сходен с очаквания по литературна справка от 6.7 до 28% [Jehee *et al.* 2008; Lattanzi *et al.* 2012; Sarovc *et al.* 2015; Passos-Bueno *et al.* 2008]. Jehee и сътрудници,

провеждат генетичен скрининг при 45 деца с краниосиностоза, състоящ се от конвенционална цитогенетика, MLPA и aCGH. Микроделеционният скрининг установява дефекти при 5 деца или 11.1% от изследваните [Jehee *et al.* 2008]. През месец май 2021 година, Atli и сътрудници провеждат генетичен скрининг при 20 деца с ендогенна краниосиностоза. Основен метод в проучването е MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации, който установява значими генетични дефекти при 5 от деца (20%). Находките са потвърдени чрез сравнителна геномна хибридизация [Atli *et al.* 2021]. В таблица 7 са представени находките от микроделеционния скрининг, съпоставени с тези от конвенционалното кариотипиране.

Таблица 7 Съпоставка на находките от конвенционалната цитогенетика и тези от MLPA.

Пациент номер	Цитогенетика	MLPA
19	46, XX	dup 22q11.21 (<i>CLDN5</i> , <i>GP1BB</i> , <i>SNAP29</i>)
31	46, XX del (18) (q22.2)	del 18q (<i>CTDP1</i> , <i>FLJ21172</i>)
36	46, XY,add(14)(p12)	dup 7p (<i>SUN1</i> , <i>ADAP1</i>)
40	46, XY	del 7q11.23 (<i>ELN</i>)
44	47, XX+21	-
57	46, XY	del 5q35.3 (<i>NSD1</i>)
62	47, XY,+mar (de novo)	dup 14p (<i>PARP2</i>)
68	46, XX, t (2;7) (q14; q35)	dup 2p16.1
82	46, XY	del 4q (<i>TRIML2</i>)
93	46, XY	del 17q21.31 (<i>MAPT</i> , <i>KANSL1</i>)

Анализът на находките от цитогенетичния и микроделеционния анализ при пациенти 31, 36, 44, 62, 68 е разгледан подробно в частта за хромозомни аберации (виж по-горе, Таблица 6).

- Пациент номер 19 (момиче на 3 месеца) се презентира с частична синостоза на левия клон на коронарния шев, микроцефалия с битемпорално стеснение, леко изразено изоставане в психо-моторното развитие и инфекция на отделителната система. Конвенционалното

цитогенетично изследване показва нормален женски кариотип, но проведенят микроделеционен анализ разкри патологична дупликация на дългото рамо на 22-ра хромозома - dup 22q11.21 със сонди в гените: *CLDN5*, *GP1BB*, *SNAP29*. Тази находка доказва диагнозата - 22q11.2 микродупликационен синдром. Това е изключително рядко състояние (около 100 описани случая в световен мащаб), следствие на малки дупликации на 22-ра хромозома [Wentzel *et al.* 2008]. Няма официална честота. Фенотипните прояви са изключително разнообразни и неспецифични, с изключение на микроретрогнатията, която е типична находка. Често при деца с този синдром се установява психо-моторно изоставане, интелектуален дефицит, нисък ръст и мускулна хипотония. Засягането на вътрешните органи е по-рядко срещано и включва сърдечни и урогенитални малформации [Kylat *et al.* 2018]. При някои от засегнатите деца, носители на тази дупликация няма видими клинични прояви. Над 75% от описаните случаи на 22q11.2 микродупликационен синдром са възникнали *de novo* в останалите 25% се предава по автозомно-доминантен механизъм [Wentzel *et al.* 2008; Kylat *et al.* 2018]. Синдромът на dup 22q11.21 се припокрива в значителна степен с клиничните прояви при нашия пациент номер 19. Родителите не се явиха за сегрегационен анализ. До колкото ни е известно това е първата описана асоциация на краниосиностоза и 22q11.2 микродупликационен синдром. Тази находка допринася за изучаването на богатия фенотипен спектър на заболяването и доказва, за пореден път, генетичната хетерогенност на синдромната краниосиностоза.

- Пациент номер 40 – момче на 10 месеца със сагитална синостоза, микроцефалия, характерен кранио-фациален дисморфизъм, скелетни аномалии, месести стъпала и лекостепенно психо-моторно изоставане. Допълнително при пациента се установи надклапна пулмонална стеноза и периферни стенози на двата клона на белодробната артерия. Както е видно от Таблица 4, хромозомния анализ показва нормален мъжки кариотип, докато MLPA верифицира диагнозата с находка - del 7q11.23

(ELN) – синдром на Williams-Beuren [Morris *et al.* 2017]. Добре познато състояние, което се характеризира с лицев дисморфизъм (широко чело, битемпорално стеснение, страбизъм, къс нос с топчест връх, издължен филтрум, дебели устни, макростомия, диастема, микрогнатия и големи ушни миди), кардиопатия (надклапна пулмонална стеноза, периферни пулмонални стенози), хиперкалциемия, хиперкалциурия, нефрокалциноза, умерено психо-моторно изоставане и поведенчески аномалии („коктейлно поведение“). Асоциацията между синдрома на Williams и краниосиностоза е позната, но изключително рядко срещана. Първото съобщение е направено от Моримото и сътрудници [Morimoto *et al.* 2003] през 2003-та година от Медицинския университет в Киото, Япония. Авторите описват, момче на 5 месеца, с типичен за синдрома на Williams лицев дисморфизъм, периферни пулмонални стенози и левокамерна хипертрофия. Проведените образни изследвания (КАТ с 3D реконструкция) на черепа показват пълна синостоза на сагиталния и частична синостоза на ламбдовидния шев. На 6-месечна възраст, детето проявява инфантилни спазми, поради което е стартирана терапия с АКТХ, по-късно заменена с ТРХ поради увеличената камерна хипертрофия. На 9 месеца е проведена неврохирургична интервенция, която коригира краниалния дефект, редуцира вътречерепното налягане, но не купира пароксизмалните прояви. Антиконвулсивната терапия е ревизирана на 15-месечна възраст, което води до преодоляване на пристъпите. Изглежда, че в представения случай епилептичните пристъпи не са причинени от наличната краниосиностоза, а са по-скоро паралелна находка. Второто съобщение по въпроса е от 2015-та година, когато авторски колектив [Ueda *et al.* 2015] от Япония описва група от 8 деца с доказан синдром на Williams и краниосиностоза. Децата са хоспитализирани в отделението по Клинична генетика в гр. Осака и по-късно в клиниката по Неврохирургия. Краниосиностозата е доказана чрез КАТ с 3D реконструкция на черепа, а синдромът на Williams чрез FISH. При пет от децата се установява сагитална синостоза, при две –

сагитална в съчетание с метопична синостоза и при едно – изолирана метопична краниосиностоза. При четири от децата е проведена неврохирургична корекция на краниалните дефекти. Всички деца са манифестирали в различна степен клиничния спектър на синдрома на Williams. Авторите подозират, че генезата на краниосиностозата в описаната група от 8 деца е различна от микроделецията на 7-ма хромозома, която предизвиква синдрома. Посочените примери, включително и нашия пациент номер 40, доказват очакваното (виж Литературен обзор) засягане на сутури по срединната линия при краниосиностоза причинена от микроделеции. От друга страна, до колкото ни е известно, нашият пациент е третият пример за тази казуистична асоциация в световен мащаб. Бъдещи насочени изследвания в тази посока биха помогнали за изясняване на генетичната етиология на краниосиностозата и синдрома на Williams.

- Пациент номер 57 е момче на 2 години със сагитална краниосиностоза, долихоцефална конфигурация на черепа, кранио-фациален дисморфизъм, двустранна плантарна трансверзална бразда, умбиликална херния и тежко изоставане в психо-моторното развитие (IQ=21) (Фигура 38). При детето са установени още: епилептични пристъпи, купирани с прием на натриев валпроат; хидронефроза I-II степен в дясно; корова атрофия и поренцефална зона в дясно фронтотемпорално от КАТ на глава. Тъй като детето е живее в ДМСГД, липсва информация за фамилната анамнеза, както и възможност за сегрегационен анализ. Генетичният скрининг започна с конвенционален хромозомен анализ, който показва нормален мъжки кариотип - 46,XY. Сравнителната геномна хибридизация (aCGH) установи хетерозиготна делеция в региона 5q35 (5q35.2-5q35.3) с размер 1.665 Mb (виж Таблица 8). Делетирани са 40 HGNC и 24 OMIM гена, включително *NSD1* и *FGFR4*. Находката беше потвърдена чрез MLPA - del 5q35.3 (*NSD1*). Този резултат верифицира диагнозата синдрома на Sotos – рядко, но добре познато състояние, предизвикващо свръхрастеж в детска възраст. Около 10 % от

засегнатите деца носят 5q35-микроделеции [Douglas *et al.* 2003]. Размерът и механизмът на възникване на въпросната микроделеция зависи до голяма степен от етническия произход на пациента [Cytrynbaum *et al.* 2005]. Клиничната манифестация при нашия пациент е типична за синдрома на Sotos, въпреки че не се установиха данни за свръхрастеж. По принцип, свръхрастежа е по-слабо проявен при децата с микроделеционна форма на Sotos, в сравнение с тези с патогенни варианти в отговорния ген *NSD1*. Douglas и сътрудници описват пациент с 5q35.3 микроделеция, включващата гените *NSD1* и *FGFR4*, и краниосиностоза [Douglas *et al.* 2003]. Фибробластният растежен фактор (FGF) и неговият рецептор (FGFR) играят основна роля в ранните етапи на скелетно развитие. Мутации в кодиращите ги гени, могат да доведат до различни костни заболявания, включително до краниосиностоза. Nie и сътрудници предполагат, че *FGFR4* е въввлечен в регулацията на лицевите и калвариалните структури, въпреки че точният механизъм остава неясен и изисква допълнителни изследвания [Nie *et al.* 2006].



Фигура 40 – Дисморфични стигми при пациент номер 57 – синдром на Sotos (Архив на Клинична генетика)

- Пациент номер 82 – момче на 4 години, което се презентира с метопична краниосиностоза, неспецифичен кранио-фациален дисморфизъм, митрална инсуфициенция, лекостепенна хипоплазия на corpus callosum и изоставащо НПР (IQ=64). Конвенционалният хромозомен анализ показва

нормален мъжки кариотип - 46,XY. MLPA установи терминална делеция на дългото рамо на хромозома 4 - del 4q (*TRIML2*), която не се асоциира с краниосиностоза (до колкото ни е известно). ArrayCGH, от друга страна, показва субмикроскопска дупликация на късото рамо на 1-ва хромозома - dup 1p22.1 (378.47 Kb), класифицирана като вариант с неясно значение. В рамките на този хромозомен регион се намират 5 генни секвенции, сред които от особено значение е гена *TGFBR3*. (виж таблица 8) Той кодира рецептор за трансформация растежен фактор тип III-бета (TGF-beta type III). Тези рецептори, заедно с групата на FGF рецепторите са широко експресирани в костните клетки и матрикс, и играят важна роля при преждевременната осификация на черепните шевове [Hunenko *et al.* 2001]. Въз основа на това, предполагаме че дупликацията на региона от 1-ва хромозома (1p22.1), съдържащ и *TGFBR3* гена обяснява краниосиностозата при нашия пациент. Този хромозомен регион се оформя като основен кандидат за допълнителни изследвания в областта на синдромната краниосиностоза. Установената хипоплазия на мазолестото тяло също е характерна находка при 1p22 микродупликациите [Sundaresan *et al.* 2019]. Разликата в находките от MLPA и aCGH се дължат на техническите ограничения на тези методи. Родителите на пациент номер 82 не се явиха за сегрегационен анализ.

Интригуваща находка са идентичните дупликации на първа хромозома - dup 1p22.1 - при пациенти номер 35 и 82. Още по интересно е, че размера на удвоения участък от късото рамо на първа хромозома е абсолютно еднакъв, а именно 378.47 Kb. Най-вероятното обяснение е възможността да се касае за еднаква по размер дупликация, но в различна позиция, включваща различни гени. Възможно е въпросната дупликация, да е с вариабилна експресивност, а именно – пациенти с еднаква мутация, но с коренно различен фенотип. От друга страна, тази находка, потвърждава сложността на генетичната етиология на синдромната краниосиностоза и допълнително затруднява диагностичния процес. Въпросният регион от късото рамо на първа хромозома подлежи на насочени изследвания.

- Пациент номер 93 – момче на 5 години със синостоза на ламбдовидния шев, кранио-фациален дисморфизъм (Фиг. 39), скелетни аномалии, незавършен тестикуларен десцензус в дясно, страбизъм на ляво око и мускулна хипотония. Установи се леко изоставащо нервно-психично, при нормално физическо развитие. Конвенционалният хромозомен анализ показва нормален мъжки кариотип - 46,XY, а MLPA – del 17q21.31 (*MAPT, KANSL1*) – делеция на дългото рамо на 17-та хромозома. Тази находка потвърждава диагнозата – синдром на Koolen-de Vries, който се характеризира с: психомоторно изоставане, интелектуален дефицит, мускулна хипотония, вродени малформации (основно на сърцето и бъбреците), крипторхизъм и поведенчески отклонения [Koolen *et al.* 2019]. Характерният за синдрома лицев дисморфизъм се изразява в: антимоногоидни очни цепки, блефарофимоза, епикант, птоза, крушовиден нос и големи ушни миди. Синдромът се предизвиква от микроделеции на дългото рамо на 17-та хромозома (както е при нашия пациент) или на патогенни варианти в *KANSL1* гена [Koolen *et al.* 2019]. Няма значителна разлика във фенотипните изяви при двете форми на синдрома. Почти всички описани случай са възникнали *de novo*. Асоциацията с краниосиностоза е позната, но много рядко срещана (при по-малко от 10 % от случаите) [Koolen *et al.* 2019]. Zollino, Marangi и сътрудници изследват генотип-фенотипните корелации в група от 32 деца със синдром на Koolen-de Vries [Zollino *et al.* 2015]. Селектирани са 27 деца носещи микроделеционната му форма (del 17q21.31) и 5 деца с патогенни варианти в *KANSL1* гена. Само при едно дете е установена сагитална краниосиностоза с хипопластичен очен булбус и ипсилатерална хипоплазия на оптичния нерв. Детето е от групата с хаплоинсуфиция 17q21.31 и е претърпяло неврохирургична интервенция в кърмаческа възраст [Zollino *et al.* 2015].

До колкото ни е известно асоциация между ламбдовидна краниосиностоза и синдрома на Koolen-de Vries при нашия пациент номер

93 е първата описана в литературата. Това е поредното потвърждение на генетичната хетерогенност при синдромната краниосиностоза.



Фигура 41 – Дисморфични стигми при пациент номер 93 – синдром на Koolen-de Vries (Архив на Клинична генетика).

3.3 Сравнителна геномна хибридизация (arrayCGH)

Проведе се при 39 деца (40.2 % от всички деца с краниосиностоза), като трета и селективна стъпка от генетичния скрининг. Селекцията на децата за aCGH беше базирана на следните критерии:

1. Тандемно приложение с MLPA за прецизиране на находките
2. Деца с неуточнени находки от предхождащите методи – кариотипиране и MLPA

Деца със слабо проявен дисморфизъм бяха изключени от групата за провеждане на aCGH. Находките от сравнителната геномна хибридизация са обобщени и съпоставени с находките от конвенционалната цитогенетика и MLPA в Таблица 8. Пациентите 57, 68 и 82 са разгледани подробно по-горе в рамките на анализа на цитогенетичните и микроделеционните находки. Находките при пациент 94 са разгледани в рамките на частта Клинична оценка на пациентите (виж по-горе).

- Пациент номер 2 – момче на 3 години с метопична краниосиностоза, която е станала причина за неврохирургична интервенция (фронтална краниопластика на 2-месечна възраст). При детето се наблюдава неспецифичен краниофациален дисморфизъм при нормално физическо и нервно-психично развитие. Допълнително се установяват поведенчески аномалии от аутистичния спектър. Конвенционалното цитогенетично изследване и микроделеционния анализ показаха нормални резултати. Проведената сравнителна геномна хибридизация установи патогенна дупликация на дългото рамо на 1-ва хромозма (1q21.1) – виж Таблица 8. Родителите на детето отказаха провеждането на сегрегационен анализ. В посочения хромозомен участък се намират 31 гена (протеин-кодиращи и регулаторни). Литературната справка не откри асоциации между тези последователности и краниосиностоза. В много редки случаи, дупликации и делеции на 1q21.1 се свързват със забавено психо-моторно развитие, аутизъм, вродени сърдечни малформации и макроцефалия в детска възраст [Brunetti-Pierri *et al.* 2008; Rosenfeld *et al.* 2012]. Това се припокрива в малка степен с клиничната картина при нашия пациент номер 2. Причината за синдромната краниосиностоза при пациент номер 2 остава неясна. Възможно в патогенезата на краниалния дефект да имат участие други, неуточнени епигенетични или външни фактори.

Таблица 8 – Обобщение на находките от aCGH, съпоставени с находките от конвенционалното кариотипиране и с тези от MLPA.

Пациент номер	Хромозомен анализ	MLPA находки	aCGH находки – ISCN анотация и размер	Клас - вариант	Кандидат гени
2	46, XY	норма	arr[hg19] 1q21.1 (144440748x2, 144510920-146188485x3, 146290655x2) (1.85Mb)	патогенен	-
15	46, XX	норма	arr[hg19] 14q32.33(105524898x2, 105609511-105787438x0, 105845682x2) (177.93Kb)	вероятно патогенен	-
57	46, XY	del 5q35.3 (NSD1)	arr[hg19] 5q35.2 (175,470,501-177,136,261x1) (1.66 Mb)	патогенен	<i>FGFR4</i>
63	46, XY	норма	arr[hg19] 1q12q21.2(120322008x2, 142513049-147134234x3, 147203277x2) (4.62 Mb)	патогенен	-
68	46,XX,t(2;7)(q14;q35)	dup 2p16.1	arr[hg19] 2p22.3p16.1(36033514x2, 36095582-61287377x3, 61369298x2) (25.19 Mb)	патогенен	<i>SIX2</i>
82	46, XY	del 4q(<i>TRIML2</i>)	arr[hg19] 1p22.1 (92258725x2, 92326818-92705290x3, 92767467x2) (378.47 Kb)	вероятно патогенен	<i>TGFBR3</i>
94	46, XY	норма	del 1q43 (747Kb), dup 22q12.3 (715Kb)	вероятно патогенен	-

Таблица 9: Обобщение на засегнатите хромозомни региони (от aCGH) и съдържащите се в тях генни секвенции

Пациент номер	aCGH находки – ISCN анотация и размери	Генни секвенции в съответния хромозомен регион (справка в геномна база данни: DGV – Build GRCh37:Feb 2009, hg19)
2	arr[hg19] 1q21.1 (144440748x2, 144510920-146188485x3, 146290655x2) (1.85Mb)	<i>NBPF20, PDE4DIP, SEC22B, HFE2, RNF115, NBPF25, PFN1P2, NOTCH2NL, POLR3GL, CD160, NBPF, microRNA 6736, NBPF member 9, NBPF member 11, NBPF member 10, NBPF member 8, LOC653513, HFEA2, TXNIP, ANKRD34A, LIX1L, RBM8A, GNRHR2, PEX11B, ITGA10, ANKRD35, PIAS3, NUDT17, POLR3C, PDZK1P1 and GPR89A.</i>
15	arr[hg19] 14q32.33(105524898x2, 105609511_105787438x0, 105845682x2) (177.93Kb)	<i>JAG2, MIR6765, NUDT14, BRF1, BTBD6 and PACS2</i>
57	arr[hg19] 5q35.2 (175,470,501-177,136,261x0) (1.66 Mb)	40 HGNC and 24 OMIM genes, including <i>NSD1</i> and <i>FGFR4</i>
63	arr[hg19] 1q12q21.2(120322008x2, 142513049_147134234x3, 147203277x2) (4.62 Mb)	<i>LINC00624, NBPF13P, NBPF12, PRKAB2, BCL9, CHD1L, FMO5, PDIA3P1, PEX11B, PDZK1, GNRHR2, RBM8A, LIX1L, ANKRD34A, POLR3GL, CD160, SEC22B, HJV, TXNIP, NBPF10, NBPF25P, NOTCH2NLA, LOC653513, NBPF9, NBPF8, PFN1P2, PPIAL4A, LINC00623, NBPF20, FAM72D, PPIAL4G, LINC01138, MIR6077, ANKRD20A12P</i>
68	arr[hg19] 2p22.3p16.1(36033514x2, 36095582_61287377x3, 61369298x2) (25.19 Mb)	<i>SLC8A1, THUMP2, TMEM178A, MAP4K3-DT, MAP4K3, CDKL4, SOS1, LOC375196, DHX57, GEMIN6, SRSF7, GALM, ATL2, CYP1B1-AS1, CYP1B1, RMDN2-AS1, RMDN2, CDC42EP3, QPCT, EIF2AK2, NDUFAF7, CEBPZOS, PRKD3, SULT6B1, HEATR5B, GPATCH11, STRN, VIT1, FEZ2, CRIM1, CRIM1-DT, SRBD1, LINC01121, SIX2, SIX3-AS1, MIR548AD, CAMKMT, PREPL, SLC3A1, PPM1B, PLEKHH2, ABCG8, LRPPRC, DYNC2L1, C1GALT1C1L, THADA, LINC01126, ZFP36L2, HAAO, OXER1, MTA3, KCNG3, EML4, PKDCC, LINC01913, FSHR, LHCGR, GTF2A1L, STON1, STON1-GTF2A1L, PPP1R21, FOXN2, FBXO11, MSH6, KCNK12, MSH2, MIR559, EPCAM, CALM2, STPG4, TTC7A, MCFD2,</i>

		LINC01119, LINC01118, SOCS5, CRIPT, PIGF, RHOQ, TMEM247, LINC02583, RHOQ-AS1, EPAS1, PRKCE, NRXN1, CCDC85A, EFEMP1, MIR216B, MIR216A, MIR217, PPP4R3B, CFAP36, PNPT1, MTIF2, MIR4426, RPS27A, CLHC1, CCDC88A, PRORS1P, RTN4, EML6, SPTBN1, RPL23AP32, C2orf73, ACYP2, MIR3682, ERLEC1, CHAC2, GPR75-ASB3, PSME4, GPR75, ASB3, LINC01122, FANCL, VRK2, PUS10, REL, PEX13, LINC01185, PAPOLG, BCL11A
82	arr[hg19] 1p22.1 (92258725x2, 92326818_92705290x3, 92767467x2) (378.47 Kb)	C1orf146, BTBD8, EPHX4, BRDT, TGFBR3
94	del 1q43 (747Kb), dup 22q12.3 (715Kb)	CHRM3, FMN2, SYN3, LARGE1

- Пациент номер 15 (момиче на 4 години и 2 месеца) се презентира със синустоза на десния клон на коронарния шев, придружена от: кранио-фациален дисморфизъм, къса шия, торакална кифоза, брахидактилия и гастро-интестинални симптоми. При детето се установиха допълнително изоставащо физическо, при нормално нервно-психическо развитие. Конвенционалният хромозомен анализ и MLPA показаха нормални резултати (виж Таблица 8). В последствие, пациента беше скрининран за субмикроскопски хромозомни аберации чрез олиго-aCGH, което показва вероятно патогенна хомозиготна делеция на дългото рамо на 14-та хромозома - 14q32.33 (177.93Kb). В този регион се намират 6 гена (виж Таблица 9), които не са асоциирани с краниосинустоза до момента. В литературата, субмикроскопски делеции на 14q се свързват с две състояния: синдром на Dubowitz [Huber *et al.* 2011] и 14q32.3 делеционен синдром [Youngs *et al.* 2011]. Поради наличието на характерна ГИТ-симптоматика и брахидактилия, сме склонни да приемем диагнозата - синдрома на Dubowitz. До колкото ни е известно, нито едно от тези редки състояния не са рапортувани във връзка с краниосинустоза. Причината

за синдромната краниосиностоза при този пациент остава неясна. Нямаме валидна информация за биологичните родители на детето.

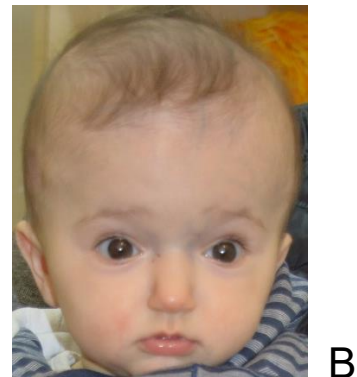
- На 5 месечна възраст, при пациент номер 63, се установи съчетание от коронарна и сагитална краниосиностоза. При хоспитализацията в Клинична генетика се откриха допълнително: неспецифичен кранио-фациален дисморфизъм, леко ризомиелично скъсяване на горни крайници и изоставащо психо-моторно развитие (IQ = 60). Проследяването на пациента установи също: рецидивиращи пневмонии, желязо-дефицитна анемия и ГЕРБ. Първите две стъпки от генетични скрининг (кариограма и MLPA) показаха нормални резултати. Сравнителната геномна хибридизация установи субмикроскопска дупликация на дългото рамо на 1-ва хромозома с размер 4.62 Mb, класифицирана като патогенен вариант (виж Таблица 8). Дуплицираният регион 1q12q21.2 съдържа 34 генни секвенции (виж Таблица 9), които не се асоциират с краниосиностоза, до колкото ни е известно. Brisset и сътрудници съобщават за комплексна находка от дупликация 1q12q21.2 (с бащин произход) в комбинация с делеция 16p11.2 (545 Kb) с майчин произход при дете с множество малформации, психомоторно изоставане, епилептични пристъпи и наднормено тегло [Brisset *et al.* 2015]. Този случай е различен от нашия пациент номер 63, поради допълнителната делеция на 16-та хромозома. Причината за възникване на краниосиностоза при пациента остава неясна на този етап.

3.4 Таргетно секвениране по Sanger и NGS панели за краниосиностоза

Проведоха се при 7 от децата (7.07%).

За таргетно секвениране бяха подбрани два пациента, при които се установиха категорични, еднопосочни и характерни данни от дисморфологичната оценка, анамнезата и клиничното изследване. Комерсиални NGS панели за краниосиностоза се използваха при 7 деца, при които имахме достатъчно клинични показания, за да подозираме наличието на моногенна краниосиностоза.

- При пациент номер 22 се установи комбинация от едностранна коронарна и сагитална краниосиностоза, водещи до предна плагицефалия. Наблюдаваха се още характерен лицев дисморфизъм, изоставашо психо-моторно развитие и парциална агенезия на corpus callosum (Фигура 40). Изследването на показателите на калциево-фосфорната обмяна не показаха значими отклонения от нормите за възрастта. Поради тежестта на краниалния дефект се наложи консултация с неврохирург с последваща планова оперативна интервенция. Отбеляза се много добър резултат по отношение на черепната геометрия, външните козметични дефекти и нервно-психичното развитие на детето (Фигура 40). Въз основа на тези клинични находки се проведе NGS панел за краниосиностоза, който установи патогенен вариант с.749C>G (p.Pro250Arg) в *FGFR3* гена. Това верифицира диагнозата синдром на Muenke (виж Литературен обзор) [Kruszka, Muenke *et al.* 2016]. Сегрегационният анализ не установи дефекти в *FGFR3* гена при родителите, което прави находката при пациент 22 – *de novo*. Синдромът на Muenke се характеризира със значително фенотипно разнообразие: коронарна синостоза (почесто билатерална), макроцефалия, среднолицева ретракция, високо небце с палатосхиза, страбизъм, загуба на слух, психомоторно изоставане, епилепсия и други.





Фигура 42 – Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 22 (синдром на Muenke): А – предоперативен дисморфизъм на 6 месечна възраст; В – резултати след краниопластика и адвансмент на 9 месечна възраст; С и D остатъчен дисморфизъм при детето на 3 годишна възраст (Архив на Клинична генетика).

- Пациент 48 - момиче на 10 години и 6 месеца, при което се установи бисиностоза (коронарна и сагитална) и долихоцефална конфигурация на главата. Наблюдаваха се още специфичен лицево-черепен дисморфизъм (широки вежди, дълги мигли, очни цепки, широк връх на носа, къс филтрум с изгладен релеф и хипотоничен фациес), скелетни аномалии (дълги и тънки пръсти), диастаза на *m. rectus abdominis* и ингвинална херния. Задължителните начални етапи от генетичния скрининг (кариограма и микроделеционен анализ) показаха нормални резултати. На базата на типичния лицев дисморфизъм и скелетни аномалии се проведе таргетно секвениране на *VPS13B* гена. Изследването установи *de novo* патогенен вариант с.8459T>C, което постави диагнозата синдром на Cohen [Wang *et al.* 2016]. Това е рядко състояние, което се характеризира с: ретинална дистрофия, прогресираща и високостепенна миопия, микроцефалия, интелектуален дефицит, мускулна хипотония, ставна хипермобилност, нисък ръст, малки и тесни ръце с дълги и тънки пръсти, центрипетално натрупване на мастна тъкан и неутропения. Типичния лицев дисморфизъм включва: широки вежди, дълги мигли, вълнообразни очни цепки, широк връх на носа, къс филтрум с изгладен релеф и хипотоничен

фациес [Wang *et al.* 2016]. Не установихме асоциации в литература между краниосинстоза и синдрома на Cohen.

- Пациент номер 96 постъпи в Клинична генетика на 7 месечна възраст, насочено от ДМСГД поради психо-моторно изоставане и тежък лицево-черепен дисморфизъм (псевдоекзофтальм, хипертелоризъм, антимонголоидни очни цепки, широк корен на носа с инвертиран връх, плътни устни, лицева асиметрия, палатковидна горна устна, ниско и асиметрично разположени ушни миди, къс врат, по-широки палци на ръцете, издължен филтрум и високо небце (Фигура 41). Проведената краниография установи коронарна краниосиностоза, водеща до турицефална конфигурация на главата. Конвенционалното цитогенетично изследване показва нормален мъжки кариотип (46, XY). Въз основа на дисморфологичната оценка и съмненията за моногенна синостоза се прибегна до NGS панел за краниосиностози. Установи се вариант с неясно значение с.1199G>T (p.Gly400Val) в *ZIC1* гена, който се асоциира със състояние, наречено: „Autosomal dominant structural brain anomalies with impaired intellectual development and craniosynostosis” (MedGen UID: 1684861). Това състояние е изключително рядко (5 описани случая в световен мащаб от Stephen Twigg) [Twigg *et al.* 2015]. Характеризира се с: микроцефалия, агенезия на мазолестото тяло, абнормна анатомия на латералните вентрикули и хипоплазия на церебеларните хемисфери. Нервнопсихичното изоставане е средно до тежко изразено. Задължителен елемент е и краниосиностозата (най-често коронарна). Допълнително могат да се наблюдава сколиоза [Vandervore *et al.* 2018]. Тъй като детето живее в ДМСГД, нямаме възможност за снемане на фамилна анамнеза и за провеждане на сегрегационен анализ.



Фигура 43 – Лицево-черепен дисморфизъм при пациент номер 96 - Autosomal dominant structural brain anomalies with impaired intellectual development and craniosynostosis (Архив на Клинична генетика).

- Пациент номер 97 се хоспитализира за диагностично уточняване по повод на: тежък хипертелоризъм, лицева асиметрия, асиметрични очни цепки, седловиден нос с раздвоен връх, къс филтрум, палатковидна горна устна, ниско и асиметрично разположени ушни миди, проминираща лява половина на коронарния шев, кефалхематом вдясно париетално, допълнителни кожни гънки аксиларно, по-широки палци (надлъжно раздвоени на краката) (Фигура 42). Наблюдаваха се още: нистагъм, спонтани и провокирани клонуси на крайниците и изразена хиперестезия. От рентгенографското изследване на череп се откри: лицева асиметрия, асиметрични очни цепки и частична сагитална синостоza, без признаци на повишено вътречерепно налягане. Конвенционалното кариотипиране и микроделеционния анализ показаха нормални резултати. На базата на гореописания фенотип се проведе NGS панел за краниосиностоzi, който установи - вариант с неясно значение, c.352A>G (p.Ser118Gly) (вероятно мозаечен) в *EFNB1* гена. Тази находка верифицира диагнозата – Краниофронтоназална дисплазия CFND [van den Elzen *et al.* 2014]. Рядко, X-свързано състояние, което се характеризира с: краниосиностоza (коронарна или по-рядко сагитална), лицева асиметрия, хипертелоризъм, широк нос с раздвоен връх, палатковидна горна устна, цепки на устните и небцето, агенезия на corpus callosum, акцесорни кожни гънки на врата и аксиларно, клинодактилия и сколиоза. Честотата на CFND е неуточнена, до момента в световен мащаб има описани около 115 случая [Twig *et al.* 2004].

Унаследява се по Х-свързан механизъм. Както е видно имаме висока степен на припокриване на клиничните особености на Краниофронтоназалната дисплазия и тези при нашия пациент номер 97, което е достатъчно основание да приемем диагнозата за верифицирана. Детето живее в ДМСГД от 49 дневна възраст, поради което нямаме информация за биологичните му родители, и съответно сегрегационен анализ е невъзможен.



Фигура 44 – Лицево-черепен дисморфизъм при пациент номер 97 – Краниофронтоназална дисплазия (Архив на Клинична генетика)

- пациент номер 98 – момче на 2 месеца с двустранна коронарна краниосиностоза и микро-брахицефална конфигурация на главата. Детето е родено от двуплодна бременност (дизиготни близнаци) – второто дете е клинично здраво. При нашия пациент се установи характерен дисморфизъм: среднолицева ретракция, хипертелоризъм, медиален епикант, удължен филтрум, ниско разположени и диспластични ушни миди (Фигура 43). Конвенционалното цитогенетично изследване показва нормален резултат – 46,XY. На базата на характерната клинична картина, проведохме таргетно секвениране на *TWIST1* гена, което установи наличието на патогенен вариант: с.301C>T(p.Gln101*), доказващ диагнозата - автозомно доминантен Saethre-Chotzen syndrome. Родителите отказаха сегрегационен анализ. Консултация с неврохирург: с мнение за провеждане на коригираща интервенция, която е отказана от родителите.

Синдромът на Saethre-Chotzen се дължи на патогенни варианти в гена *TWIST1*, който се намира на 7-ма хромоза [de Heer *et al.* 2005]. Характерният

фениотип включва: едно- или двустранна коронарна краниосиностоза, лицева асиметрия, хипертелоризъм, аномалии на твърдото небце, максиларна хипоплазия, птоза, малки и диспластични ушни миди, кожна синдактилия на втори и трети пръст на ръцете. По-рядко синдромът се асоциира с обструктивна сънна апнея, нисък ръст и вродени сърдечни аномалии [Cai *et al.* 2003; Cho *et al.* 2013].

Синдрома на Saethre-Chotzen се унаследява по автозомно-доминантен механизъм, но повечето случаи възникват *de novo*. Честотата на синдрома е около 1 на 50 000 новородени деца. Нервно-психичното развитие обичайно е нормално [de Heer *et al.* 2005]. Терапевтичният подход често е неврохирургичен.



Фигура 45 – Дисморфични стигми при пациент номер 98 – синдром на Saethre-Chotzen (Архив на Клинична генетика).

- пациент номер 99 - момче на 2 месеца с едностранна коронарна краниосиностоза и плагицефална конфигурация на главата. Наблюдава се следния дисморфизъм: проптоза, хипертелоризъм, дивергентен, двустранен страбизъм, хипопластични зигоматични арки, среднолицева ретракция, лека лицева асиметрия, микроретрогнатия, ниско разположени и ротирани назад ушни миди със заострен горен край (Фигура 44). Проведени са конвенционално кариотипиране и микроделеционен анализ – в норма. Поради фенотипните белези за моногенна краниосиностоза се проведе NGS панел – краниостенози (9 гена). Установи се патологичен вариант с.1021A>C (p.Thr341Pro) в *FGFR2* гена в хетерозиготно

състояние – доказващо диагнозата – синдром на Pfeiffer тип 1. Детето се проследява от неврохирург.

Синдромът на Pfeiffer е рядко (1:100 000 новородени деца) състояние, което се характеризира с първична краниосиностоза, среднолицева хипоплазия, широки палци на ръцете (и краката) и мекотъканна синдактилия [Das *et al.* 2022]. I-ви тип се причинява от дефекти в гените *FGFR1* и *FGFR2*. Тип II и III се причиняват от патогенни варианти в *FGFR2* [Rai *et al.* 2022; Glaser *et al.* 2000]. Краниосиностозата при синдрома на Pfeiffer е комплексна (едновременна осификация на два или повече от черепно-мозъчните шевове), което води до различни краниални деформации (в някои случаи конфигурацията на черепа се определя като „детелиновидна“) [Medina *et al.* 2009]. Психо-моторното развитие варира от нормално до тежко изоставащо. Могат да се наблюдават и комбинации от зрителни, слухови и дихателни увреждания. Състоянието се унаследява по автозомно-доминантен механизъм. Терапевтичните опции са предимно неврохирургични (декомпресионни и козметични) [Greig *et al.* 2022; Khonsari *et al.* 2016; Spruijt *et al.* 2016].



Фигура 46 – Дисморфични стигми при пациент номер 99 – синдром на Pfeiffer тип 1 (Архив на Клинична генетика).

4. Метаболитни находки при децата с краниосиностоза

Метаболитните изследвания не са показани при диагностиката на синдромната и изолирана краниосиностоза. Поради определени клинични и лабораторни показатели, при част от децата се проведеха:

- Метаболитен скрининг (аминокиселини в кръв, ацилкарнитини в кръв, органични киселини в урина) – при 23 деца (23.2%)
- Изследване за мутации в митохондриална ДНК – при 13 деца (13.1%)
- Изследване на плазмените нива на амоняк и лактат – при 3 деца (3.03%)
- Изследване на плазмените нива на витамин В12 и Хомоцистеин при 1 дете (1.01%)
- Количествено изследване за мукополизахариди в урина (ГАГ в урината) – при 11 деца (11.11%)

Таблица 10 – Обобщение на метаболитните находки при изследваните деца с краниосиностоза

Пациент номер	Краниосиностоза	Находка
12	частична сагитална и коронарна	TMS, В12 - констелация за дефицит на Кобаламин G. Таргетно секвениране на <i>MTR</i> – гена – два патологични варианта – с.3518C>T (P1173L) / с.3613G>T (E1204X)
24	сагитална	ГАГ в урина: 100.27 mg/mmol Cr [5.4-14.2], ELpho HS – MPS III (Sanfilippo)
32	коронарна	амоняк (148 µmol/l)

Както е видно от Таблица 10, метаболитните находки се срещат относително рядко в изследваната група деца с краниосиностоза. Значими дефекти се откриха при само трима от пациентите – 12, 24 и 32.

- Пациент номер 12 (момиче на 1 година и 1 месец) се презентира с частична сагитална и коронарна краниосиностоза (Таблица 10), нормално физическо, при леко изоставащо нервно-психично развитие и рефрактерна епилепсия. Конвенционалната цитогенетика, MLPA и сравнителната геномна хибридизация дадоха нормални резултати. Допълнително при пациента се установиха: нормални нива на витамин В12, увеличен хомоцистеин, а от метаболитен скрининг – понижени нива на метионин. Това е характерна констелация за дефицит на Кобаламин G, което беше потвърдено чрез таргетно секвениране на отговорния ген – *MTR*. Установиха се два патогенни варианта – с.3518 C>T (P1173L) / с.3613 G>T (E1204X) – смесен хетерозигот. Sloan, Carillo и сътрудници публикуват литературна справка посветена на интрацелуларните нарушения на кобаламиновия метаболизъм [Sloan *et al.* 2021]. Авторите съобщават за асоциация на дефицит на Кобаламин G и прогресивна микроцефалия, но до момента не са установени асоциации с краниосиностоза. Пациента подлежи на допълнителни изследвания, тъй като етиологията на синдромната краниосиностоза остава неуточнена.
- При пациент номер 24 (момиче на 2 години и 3 месеца) се установи сагитална краниосиностоза с долихомакроцефална конфигурация на главата при нормално физическо и нервно-психично развитие. Допълнително се наблюдаваха – макроглия, хиперпигментни петна по тялото и тесни слухови канали. Детето боледува често от остри респираторни инфекции, от около 1-годишна възраст е регистрирана лекостепенна хепато-спленомегалия. Поради сънна апнея, детето спи със спомагателен апарат (CPAP). Фамилната анамнеза разкри следното: майка с бронхиална астма и Хепатит В; син на сестрата на майката (първи братовчед) с болест на Sanfilippo B. Конвенционалното цитогенетично изследване показва нормален женски кариотип – 46,XX. MLPA за

- микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации също даде нормален резултат. Количественото изследване на мукополизахариди в урина даде патологични стойност - 100.27 mg/mmol Cr, при норма за възрастта от 5.4 до 14.2 mg/mmol Cr. На следващ етап се проведе качествен анализ на ГАГ, а след това и ензимна диагностика. Последната показва резултати характерни за мукополизахаридоза тип III B (болест на Sanfilippo). По технически причини не се направи ДНК анализ за това заболяване. В литературната справка не установихме данни за асоциация на краниосиностоза и синдрома на Sanfilippo - за разлика от повечето мукополизахаридози, където краниосиностозата присъства като ранен и усложняващ прогнозата фактор (виж Литературен обзор).
- Пациент 32 – момче на 7 месеца с коронарна краниосиностоза, неспецифичен дисморфизъм (предимно лицево-черепен), ранна и неравномерна осификация на парияталните кости и ризомиелично скъсяване на горни крайници (Фигура 45). Допълнително се установи тежко изоставашо физическо, при нормално нервно-психично развитие (IQ=85). Фамилната анамнеза разкри близкородствен брак – родителите на детето са първи братовчеди. Генетичния скрининг установи: нормален мъжки кариотип – 46, XY; нормален резултат от MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации; вероятно бенигна делеция на късото рамо на 2-ра хромозома - del 2p22.3 (50.89Kb) /2/ и бенигна дупликация на дългото рамо на 17-та хромозома dup 17q21.31 (346.85Kb) /1/. Тези находки не обясняват клиничната картина при пациента. При изследване на плазменото ниво на амоняк се установи патологично висок резултат - 148 $\mu\text{mol/l}$ при норма за възрастта до 11-32 $\mu\text{mol/l}$. Резултатите от метаболитен скрининг (аминокиселини в кръв, ацилкарнитини в кръв, органични киселини в урина) бяха нормални. Хиперамонемията е характерна находка при някои от вродените грешки на обмяната – дефектите на урейния цикъл (ДУЦ), част от органичните ацидемии (пропионова, метилмалонова, изовалерианова) и при дефицит на карбоанхидраза тип VA. Други възможни причини са: тежки увреждания

на черния дроб (метаболитни, инфекциозни, автоимунни, цироза), остра бъбречна недостатъчност и крайните стадии на хронично бъбречно увреждане. Хиперамониемия може да се наблюдава и като нежелана лекарствена реакция при терапия с натриев валпроат и циклофосфамид. Проведените до момента изследвания при нашия пациент не установиха етиологията на хиперамониемията. Емпирично се започна терапия с Натриев фенилбутират. В резултат на тази терапия, нивата на амоняк при нашия пациент се редуцираха до 57/68 $\mu\text{mol/l}$. Препоръча се диета с рестрикция на протеиновия прием. Пациентът не е постъпвал за контрол на състоянието в Клинична генетика от 2017-та година. Литературната справка не установи причинно-следствени връзки между хиперамониемия и краниосиностоза. Пациента подлежи на допълнителни изследвания.



Фигура 47 – Дистморфични стигми при пациент номер 32 – неуточнена хиперамониемия, краниосиностоза и косангвининтет в семейството

VI. Изводи

1. Морфологичните и антропометрични характеристики при селектирана група от български деца с краниосиностоза, кореспондират до голяма степен, но не напълно, с очакваните по литературни данни.
2. Поради особеностите на показанията за хоспитализация в Клинична генетика, 96.9% от децата които изследвахме бяха със синдромна краниосиностоза.
3. Разпределението по засегнат шев в групата на български деца със синдромна краниосиностоза е различно от очакваното – ламбдовидния шев е по-често засегнат от метопичния.
4. Конвенционалната краниография в минимум две проекции е достатъчна за обективизиране на състоянието на черепно-мозъчните шевове. Методът е достъпен и сравнително безвреден. КАТ е задължителен при случай със комплексна синостоза и при засягане на черепната основа.
5. Ранното поставяне на диагнозата (насочена от най-честите дисморфични стигми и доказана рентгенография на черепа) е от основно значение за терапевтичните опции и резултати.
6. Въпреки, че отклоненията в показателите на калциево-фосфорната обмяна са редки (наблюдаваха се само при 3.03 % от децата), те остават неделима част от клиничната оценка на децата с краниосиностоза.
7. Процентът на значимите хромозомни аберации (12.12%) в групата на деца със синдромна краниосиностоза е значителен и доказва ролята на хромозомните преустройства в патогенезата на тези състояния. От друга страна, този извод, показва и необходимостта от провеждане на конвенционално цитогенетично изследване при деца с краниосиностоза.
8. Цитогенетичните находки са твърде разнообразни и несистемни, което не позволява асоциацията на конкретни хромозомни аберации с определен тип краниална синостоза.
9. Процентът на микроструктурни аберации (10.1%) в групата на деца със синдромна краниосиностоза, установени чрез MLPA също е значителен и

- доказва ролята на тези дефекти в етиопатогенезата на синдромната краниосиностоза.
10. Макар и рядко, краниосиностозата може да бъде част от фенотипните прояви на различни познати синдроми (Sotos, Cohen, Williams, Koolen-de Vries).
 11. Субмикроскопските хромозомни аберации са сред най-честите и основни причини за възникване на синдромна краниосиностоза в нашата група пациенти. Това се доказва от сравнително високия процент находки (17.9%) от aCGH. Дупликациите (повишен генен дозаж) се срещат по-често от делециите, което доказва водещата им роля в етиологията на краниосиностозата.
 12. Диагностичната стойност на aCGH се доказва от факта, че значителна част от децата с нормален кариотип (приблизително 5.6%), носят субмикроскопски хромозомни пренареждания.
 13. Таргетното секвениране и методите на новогенерационното секвениране (панели, цялостно екзомно секвениране) са основните методи на избор при генетичната верификация на деца със съмнение за моногенна краниосиностоза.
 14. Ролята на гените *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *TWIST1*, *EFNB1* се потвърди при децата със синдромната краниосиностоза.
 15. Конвенционалното кариотипиране е ефективен и достъпен метод за диагностика на деца с краниосиностоза, но пропуска субмикроскопските и точковите мутации. Уместно е да се провежда като първа стъпка в процеса на генетично уточняване на децата.
 16. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации и aCGH са по-ефективни и по-прецизни в сравнение с кариотипирането, но също така са по-скъпи и изискват достъп до специализирана лаборатория. Препоръчително е да се използват тандемно, като втора стъпка от скрининга, за максимално прецизиране на находките при всички деца със синдромна краниосиностоза.

17. Дупликациите (повишен генен дозаж) се срещат по-често от делециите, което доказва водещата им роля в етиологията на краниосиностозата
18. Пълното екзомно и пълно геномно секвениране осигуряват пълноценен скрининг на целия геном. Недостатъци са нееднозначните находки, висока цена, ниска специфичност.
19. Вродените грешки на обмяната играят ограничена роля в етиологията и патогенезата на синдромната краниосиностоза в нашата група деца.

VII. Приноси

1. Приноси с научен характер – оригинални:

1. Установиха се нови хромозомни локуси, свързани с етиологията на синдромната краниосиностоза.
2. Установи се асоциация между повишения дозаж на гена *SIX2* и преждевременната осификация на краниалните шевове.
3. За първи път се установи асоциация между ламбдовидна краниосиностоза и синдрома на Koolen De Vries.
4. За първи път се установи асоциация между 15q микродупликационен синдром и ламбдовидна краниосиностоза.
5. Диагностициран е за първи път вариант в *ZIC1* гена - с.1199G>T (p.Gly400Val), предизвикващ състоянието BAIDCS.
6. За първи път е направена подробна морфологична и генетична характеристика на голяма група български пациенти с краниосиностоза.

2. Приноси с научен характер – потвърдителни:

1. Потвърди се асоциация между краниосиностоза и някои синдроми (Down, Cohen, Williams, Sotos)
2. Потвърди се ролята на моногенните дефекти при пациенти със синдромна краниосиностоза

3. Потвърди се ролята и честотата на хромозомните аберации при пациенти със синдромна краниосиностоза.
4. Потвърди се ролята и честота на субмикроскопските небалансирани аберации при пациенти със синдромна краниосиностоза.

3. Приноси с приложен характер:

1. Изработен е диагностичен алгоритъм, адаптиран за нуждите на български деца с краниосиностоза.
2. Всички деца с потвърдена краниосиностоза се консултираха с неврохирург. 13 от тях претърпяха оперативни намеси с добри резултати.
3. Поставена е етиологична диагноза при 17 деца с краниосиностоза. Предоставена е генетична консултация на техните семейства.
4. Създадена е ДНК банка от пациенти с краниосиностоза и част от техните родители, която е необходима база за бъдещи изследвания от нова генерация

VIII. Приложения

1. Приложение 1

Обща таблица (моля вижте приложения Excel-файл) съдържащата основната информация за всички пациенти, включени в настоящия дисертационен труд.

2. Приложение 2

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА ПАЦИЕНТА

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам проекта с:

.....
.....

Давам разрешение от името на детето ми на:

Д-р(име на лекаря)

от (месторабота)

- за изследване на ДНК от венозна кръв, получена чрез венепункция за анализ с високорезолютивна микрочипова технология: aCGH и MLPA;
- за изолиране и култивиране на лимфоцити от венозна кръв с цел – провеждането на конвенционално цитогенетично изследване.

Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

1. Осведомен/а съм, че ДНК-анализът има за цел да установи има ли генетична причина за заболяването на детето ми, която не може да бъде диагностицирана с използваните рутинни методи**Да / Не**

2. След верифициране на резултата в генетичната лаборатория, бих искал да науча резултата от генетичния анализ от клинично-генетичния екип**Да / Не**

3. Съгласен/а съм да предоставя:

- Анонимни клинични и генетични данни, отнасящи се до детето ми за регистриране

в база данни **Да / Не**

- Снимки на детето ми **Да / Не**

Разбирам, че:

1. Името на детето ми няма да бъде публикувано.
2. Проби от родителите могат да бъдат поискани с оглед да се интерпретират резултатите от микрочиповия анализ на детето.
3. В някои случаи резултатът, който ще получа може да е с определен процент на вероятност.

3. Приложение 3

ИНФОРМИРАНО СЪГЛАСИЕ ЗА РОДИТЕЛИТЕ НА ПАЦИЕНТА

Получих информацията за това изследване и имах възможност да дискутирам проекта с:

.....
.....

Давам разрешение на:

Д-р(име на лекаря)

от (месторабота)

за изследване на ДНК от венозна кръв, получена чрез венепункция за анализ с високорезолютивна микрочипова технология (aCGH). Имах възможност да задам допълнителни въпроси и да дискутирам следните параграфи:

1. Осведомен/а съм , че ДНК-анализът ще се проведе с оглед да се интерпретират резултатите от микрочиповия анализ на детето ми**Да / Не**

2. След верифициране на резултата в генетичната лаборатория, бих искал да науча резултата от генетичния анализ от клинично-генетичния екип**Да / Не**

3. Съгласен/а съм да предоставя:

- Анонимни клинични и генетични данни, отнасящи се до детето ми за регистриране

в база данни**Да / Не**

- Да бъде фотографиран/а**Да / Не**

4. Прочетох приложението „Информация за пациента”**Да / Не**

Разбирам, че:

1. Името ми няма да бъде публикувано.
2. При разрешителните възможности на метода сравняването на резултатите на родителите и детето може да докаже или отхвърли бащинство. Имах възможността да дискутирам тези въпроси с лекуващия ми лекар.
3. В някои случаи резултатът, който ще получа може да е с определен процент на вероятност.
4. Наличните ДНК методи могат да се окажат неинформативни в моето семейство.
5. Ако роднинските връзки, които съм заявил/а не са верни, могат да се появят грешки в интерпретацията на резултатите.
6. В някои случаи взетият материал за анализ може да се окаже недостатъчен или некачествен и тогава се налага повторно вземане на материал.

Име **на**
пациента/родителя:.....
.....

Подпис на пациента/родителя:

.....

.....

Дата:.....

.....

Подпис на лекаря:

.....

Дата:.....

Моля, подпишете две копия и запазете едното за Вас

4. Приложение 4 Диагностичен алгоритъм при български деца с краниосиностоза



IX. Литературни източници

1. Авджиева-Тзавелла, Д. (2012). Клинико-генетична хетерогенност при пациенти с разстройства от аутистичния спектър. Дисертация, София
2. Хаджидекова, С. (2011). Микроструктурни геномни аберации при пациенти с вродени малформации. Дисертация, София
3. Бояджиев С, Янева Н, Кънева Р, Симеонов Е: Молекулярна генетика на краниосиностозата. Сп. Педиатрия Том 4, 2015, 3–14
4. Тончева Д., Хаджидекова С. и сътрудници: Медицинска генетика и геномика, учебник, София, 2020: 64-75
5. Cohen MM, MacLean RE: Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 2000.
6. Sarovic D, Vujotic L, Craniosynostosis, PhD thesis, University of Belgrade School of Medicine, Belgrade 2015
7. Rice DP (ed): Craniofacial Sutures: Development, Disease and Treatment. Front Oral Biol. Basel, Karger, 2008.
8. Gorlin RJ, Cohen MM Jr, Hennekam RCM: Syndromes of the Head and Neck, 4th ed. (Oxford Monographs on Medical Genetics. Vol. 42). Oxford, Oxford University Press, 2001.
9. Merrill AE, Bochukova EG, Brugger SM, Ishii M, Pilz DT, et al: Cell mixing at a neural crest-mesoderm boundary and deficient ephrin- Eph signaling in the pathogenesis of craniosynostosis. Hum Mol Genet 2006; 15:1319– 1328.
10. Twigg SR, Kan R, Babbs C, Bochukova EG, Robertson SP, et al: Mutations of ephrin- B1 (*EFNB1*), a marker of tissue boundary formation, cause craniofrontonasal syndrome. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:8652– 8657.
11. Hunenko O, Karmacharya J, Ong G, Kirschner RE: Toward an understanding of nonsyndromic craniosynostosis: altered patterns of TGF- beta receptor and FGF receptor expression induced by intrauterine head constraint. Ann Plast Surg 2001; 46:546– 553, discussion 553–554.
12. Gracia A, Martínez-Lage J, Arsuaga JR, Martínez I, Lorenzo C, Pérez-Espejo MA: The earliest evidence of true lambdoid craniosynostosis: the case of “Benjamina”, a Homo

- heidelbergensis child. *Childs Nerv Syst* (2010) 26:723–727, DOI 10.1007/s00381-010-1133-y
13. Obladen M, MD: In God's Image? The Tradition of Infant Head Shaping. *Journal of Child Neurology* 27(5) 672-680^a 2012 DOI: 10.1177/0883073811432749
 14. Ita M.I.; Batool Rizvi M: Brachycephaly, GeneReviews - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567709/>, May 2022
 15. Kumar A, De Jesus O: Plagiocephaly, GeneReviews - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564334/>, May 2022
 16. Fernández-de Thomas J, De Jesus O: Trigonoccephaly, GeneReviews - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK565874/>, December 2021
 17. Douglas J, Hanks S, Temple IK, Davies S, Murray A, Upadhyaya M, Tomkins S, Hughes HE, Cole TR, Rahman N: NSD1 mutations are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. *Am J Hum Genet* 2003; 72:132–143.
 18. Nie X, Luukko K, Kettunen P: FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *J. Oral Diseases*, Vol.12, Issue 2, 2006: 102-111
 19. Down Leitch V: Changing the face of craniosynostosis: The role of RBP4 in osteogenesis and suture fusion, PhD thesis, Adelaide Nov. 2010
 20. Al-Rekabi Z, Cunningham M.L, Sniadecki N: Cell Mechanics of Craniosynostosis, *ACS Biomater. Sci. Eng*, DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00557, Dec 2016
 21. Lattanzi W, Barba M, Di Pietro L, Boyadjiev S.A: Genetic advances in craniosynostosis, *American Journal of Medical Genetics*, Jan 2017
 22. Graham J.M, Sanchez-Lara P.A: Smith's Recognizable Patterns of Human Deformation, textbook, Elsevier, ISBN: 978-0-323-29494-2, 2016, 8:191-240
 23. Wilkie A, Byren C, Hurst J.A, Jayamohan J, Johnson D, Knight L, Lester T, Richards P.G, Twigg S., Wall S.A - Prevalence and Complications of Single-Gene and Chromosomal Disorders in Craniosynostosis, *American Academy of Pediatrics*, April 2010, doi:10.1542/peds.2009-3491
 24. Iseki K, Hagino S, Mori T, Zhang Y, Yokoya S, Takaki H, Tase C, Murakawa M, Wanaka A. Increased syndecan expression by pleiotrophin and FGF receptor-expressing astrocytes in injured brain tissue. *J. Glia*, Vol. 39, Issue 1, 2002: 1-9
 25. Aviv R.I, Rodger E, Hall C.M. Craniosynostosis. Pictorial Review. *Clinical Radiology*, UK, London 2002 57: 93-102

26. Helfer T, Peixoto A, Tonni G, Araujo Junior E. Craniosynostosis: prenatal diagnosis by 2D/3D ultrasound, magnetic resonance imaging and computed tomography. *Med Ultrason* 2016, Vol.18, 3:378-385
27. Lee J.C. Craniosynostosis and rare craniofacial clefts. Diagnosis, Treatment, Outcomes. E-Textbook. ISBN: 978-1-53610-102-7 (e-book), New York 2016
28. Lajeunie E, Barcik U, Thorne JA, El Ghouzzi V, Bourgeois M, Renier D: Craniosynostosis and fetal exposure to sodium valproate. *J Neurosurg* 2001;95: 778– 782.
29. Wilkie AOM, Bochukova EG, Hansen RMS, Taylor IB, Rannan-Eliya SV, Byren JC, Wall SA, Ramos L, Venancio M, Hurst JA, O'Rourke AW, Williams LJ, Seller A, Lester T. Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. *Am J Med Genet Part A* 2006;143A:1941–9.
30. Jehee FS, Krepischi-Santos AC, Rocha K.M, Passos-Bueno MR, High frequency of submicroscopic chromosomal imbalances in patients with syndromic craniosynostosis detected by a combined approach of microsatellite segregation analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification and array-based comparative genome hybridization, *J Med Genet* 2008;45:447–450. doi:10.1136/jmg.2007.057042
31. Jehee FS, Johnson D, Alonso LG, Cavalcanti DP, de Sa Moreira E, Alberto FL, Kok F, Kim C, Wall SA, Jabs EW, Boyadjiev SA, Wilkie AO, Passos-Bueno MR. Molecular screening for microdeletions at 9p22–p24 and 11q23–q24 in a large cohort of patients with trigonocephaly. *Clin Genet* 2005; 67:503–10.
32. Krepischi-Santos AC, Vianna-Morgante AM, Jehee FS, Passos-Bueno MR, Knijnenburg J, Szuhai, Sloos W, Mazzeu JF, Kok F, Cheroki c, Otto PA, Mingroni-Netto RC, Varela M, Koiffmann C, Rosenberg C. Whole-genome array-CGH screening in undiagnosed syndromic patients: old syndromes revisited and new alterations. *Cytogenet Genome Res* 2006; 115:254–61.
33. Jehee FS, Bertola DR, Yelavarthi KK, Krepischi-Santos AC, Kim C, Vianna-Morgante AM, Vermeesch JR, Passos-Bueno MR. An 11q11–q13.3 duplication, including FGF3 and FGF4 genes, in a patient with syndromic multiple craniosynostoses. *Am J Med Genet A* 2007; 143:1912–18.
34. Hibberd CE, Bowdin S, Arudchelvan Y, Forrest CR, Brakora KA, Marcucio RS, Gong SG. FGFR-associated craniosynostosis syndromes and gastrointestinal defects. *Am J Med Genet A*. 2016 Dec;170(12):3215-3221. doi: 10.1002/ajmg.a.37862.
35. Barik M, Bajpai M, Malhotra A, Samantaray JC, Dwivedi S, Das S. Novel mutation detection of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) gene, FGFR2IIIa, FGFR2IIIb, FGFR2IIIc,

- FGFR3, FGFR4 gene for craniosynostosis: A prospective study in Asian Indian patient. *J Pediatr Neurosci*. 2015 Jul-Sep;10(3):207-13. doi: 10.4103/1817-1745.165659.
36. Rai R, Iwanaga J, Dupont G, Oskouian RJ, Loukas M, Oakes WJ, Tubbs RS. Pfeiffer type 2 syndrome: review with updates on its genetics and molecular biology. *Childs Nerv Syst*. 2019 Feb 11. doi: 10.1007/s00381-019-04082-7
 37. Sawh-Martinez R, Steinbacher DM. Syndromic Craniosynostosis. *Clin Plast Surg*. 2019 Apr;46(2):141-155. doi: 10.1016/j.cps.2018.11.009.
 38. Bradley JP, Levine JP, Blewett C, Krummel T, Mccarthy JG, Longaker MT. Studies in Cranial Suture Biology: In Vitro Cranial Suture Fusion. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*. 1996;33(2):150-156. doi:10.1597/1545-1569_1996_033_0150_sicsbv_2.3.co_2
 39. Chang B.S, Lowenstein D.H. Review Article: Epilepsy – mechanisms of disease. *N Engl J Med* 2003; 349:1257-66
 40. Stanbouly D, Radley B, Steinberg B, Ascherman J.A. What Are the Risk Factors for Epilepsy Among Patients With Craniosynostosis? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2022, Vol 80,(7):1191-1197, ISSN 0278-2391, doi.org/10.1016/j.joms.2022.02.005.
 41. Ko JM. Genetic Syndromes Associated with Craniosynostosis. *J Korean Neurosurg Soc*. 2016 May;59(3):187-91. doi: 10.3340/jkns.2016.59.3.187.
 42. Morimoto M, An B, Ogami A, Shin N, Sugino Yu, Sawai Ya, Usuku T, Tanaka M, Hirai K, Nishimura A, Hasegawa K, Sugimoto T. Case Report: Infantile spasms in a patient with Williams syndrome and craniosynostosis. *Japan, Kyoto, Epilepsia* 2003, 44(11):1459-1462
 43. Ueda K, Yamada J, Takemoto O, Okamoto N. Clinical report Eight patients with Williams syndrome and craniosynostosis. *European Journal of Medical Genetics* 2015, 58: 355-357
 44. Agochukwu NB, Solomon BD, Gropman AL, Muenke M. Epilepsy in Muenke syndrome: FGFR3-related craniosynostosis. *Pediatr Neurol*. 2012 Nov;47(5):355-61. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2012.07.004. PMID: 23044018; PMCID: PMC4133743.
 45. Hall BD, Cadle RG, Golabi M, Morris CA, Cohen MM Jr. Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Am J Med Genet*. 1992 Sep 1;44(1):82-9. doi: 10.1002/ajmg.1320440120. PMID: 1519658.
 46. Eun SH, Ha KS, Je BK, Lee ES, Choi BM, Lee JH, Eun BL, Yoo KH. The first Korean case of Beare-Stevenson syndrome with a Tyr375Cys mutation in the fibroblast growth factor receptor 2 gene. *J Korean Med Sci*. 2007 Apr;22(2):352-6. doi: 10.3346/jkms.2007.22.2.352.
 47. McGaughran J, Sinnott S, Susman R, Buckley MF, Elakis G, Cox T, Roscioli T. A case of Beare-Stevenson syndrome with a broad spectrum of features and a review of the FGFR2

- Y375C mutation phenotype. *Clin Dysmorphol.* 2006 Apr;15(2):89-93. doi: 10.1097/01.mcd.0000194407.92676.9d.
48. Merrill AE, Sarukhanov A, Krejci P, Idoni B, Camacho N, Estrada KD, Lyons KM, Deixler H, Robinson H, Chitayat D, Curry CJ, Lachman RS, Wilcox WR, Krakow D. Bent bone dysplasia-FGFR2 type, a distinct skeletal disorder, has deficient canonical FGF signaling. *Am J Hum Genet.* 2012 Mar 9;90(3):550-7. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.02.005.
 49. Jehee FS, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Opitz JM, Krepisch-Santos AC, Knijnenburg J, Froyen G, Kok F, Passos-Bueno MR. An Xq22.3 duplication detected by comparative genomic hybridization microarray (Array-CGH) defines a new locus (FGS5) for FG syndrome. *Am J Med Genet A* 2005; 139:221–6.
 50. Junaid M, Slack-Smith L, Wong K. Association between craniofacial anomalies, intellectual disability, and autism spectrum disorder: Western Australian population-based study. *Pediatr Res* (2022). <https://doi.org/10.1038/s41390-022-02024-9>
 51. Huang X, Xie Y, Fang Q. 22q12.3 microduplication overlapping the *LARGE* gene as a male-only affected loci responsible for increasing the risk of autism spectrum disorder. *Biomed Rep.* 2017 Jul;7(1):51-55. doi: 10.3892/br.2017.923.
 52. Sundaresan L, Kumar P, Manivannan J, Balaguru UM, Kasiviswanathan D, Veeriah V, Anishetty S, Chatterjee S. Thalidomide, and Its Analogs Differentially Target Fibroblast Growth Factor Receptors: Thalidomide Suppresses FGFR Gene Expression while Pomalidomide Dampens FGFR2 Activity. *Chem Res Toxicol.* 2019 Apr 15;32(4):589-602. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00286.
 53. Matoso E, Melo JB, Ferreira SI, Jardim A, Castelo TM, Weise A, Carreira IM. Insertional translocation leading to a 4q13 duplication including the *EPHA5* gene in two siblings with attention-deficit hyperactivity disorder. *Am J Med Genet* 2013. Part A 161A:1923–1928.
 54. Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepisch-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances presents both in affected children and normal parents. *J Med Genet* 2006; 43:180–6.
 55. Celie KB, Yuan M, Cunniff C, Bogue J, Hoffman C, Imahiyerobo T. Rapidly Progressive Multisutural Craniosynostosis in a Patient with Jackson-Weiss Syndrome and a De Novo *FGFR2* Pathogenic Variant. *Cleft Palate Craniofac J.* 2019 Nov;56(10):1386-1392. doi: 10.1177/1055665619851642

56. Bonaventure J, El Ghouzzi V. Molecular and cellular bases of syndromic craniosynostoses. Cambridge University Press, Vol. 5; 29 January 2003, DOI: 10.1017/S1462399403005751
57. De Vries BB, Winter R, Schinzel A, van Ravenswaaij-Arts C. Telomeres: a diagnosis at the end of the chromosomes. *J Med Genet* 2003; 40:385–98.
58. Lattanzi W, Bukvic N, Barba M, Tamburrini G, Bernardini C, Michetti F, Di Rocco S. Genetic basis of single-suture synostoses: genes, chromosomes, and clinical implications. *Childs Nerv Syst* (2012) 28:1301–1310. DOI 10.1007/s00381-012-1781-1
59. Ibarra-Arce A, Almaraz-Salinas M, Martínez-Rosas V, Ortiz de Zárate-Alarcón G, Flores-Peña L, Romero-Valdovinos M, Olivo-Díaz A. Clinical study, and some molecular features of Mexican patients with syndromic craniosynostosis. *Mol Genet Genomic Med*. 2020 Aug;8(8): e1266. doi: 10.1002/mgg3.1266
60. de Ângelis Ramos D, Matushita H, Cardeal DD, Nascimento CNG, Teixeira MJ. Apert syndrome without craniosynostosis. *Childs Nerv Syst*. 2019 Mar;35(3):565-567. doi: 10.1007/s00381-019-04050-1.
61. Chun K, Teebi A, Azimi C, Steele L, Ray P. Screening of Patients with Craniosynostosis: Molecular Strategy. *American Journal of Medical Genetics* (2003) 120A:470–473
62. Cunningham ML, Seto ML, Ratisoontorn C, Heike CL, Hing AV. Syndromic craniosynostosis: from history to hydrogen bonds. *Orthod Craniofac Res*. 2007 May;10(2):67-81. doi: 10.1111/j.1601-6343.2007.00389.
63. Cai J, Goodman BK, Patel AS, Mulliken JB, Van Maldergem L, Hoganson GE, Paznekas WA, Ben-Neriah Z, Sheffer R, Cunningham ML, Daentl DL, Jabs EW. Increased risk for developmental delay in Saethre-Chotzen syndrome is associated with TWIST deletions: an improved strategy for TWIST mutation screening. *Hum Genet*. 2003 Dec;114(1):68-76. doi: 10.1007/s00439-003-1012-7.
64. de Heer IM, de Klein A, van den Ouweland AM, Vermeij-Keers C, Wouters CH, Vaandrager JM, Hovius SE, Hoogeboom JM. Clinical and genetic analysis of patients with Saethre-Chotzen syndrome. *Plast Reconstr Surg*. 2005 Jun;115(7):1894-902; discussion 1903-5. doi: 10.1097/01.prs.0000165278.72168.51.
65. Koolen D.A, Morgan A, de Vries B.B. Koolen de-Vries Syndrome. *GeneReviews* June 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK24676/>
66. Oldani E, Gare C, Bucourt M and Carbillon L. Prenatal diagnosis of Antley-Bixler syndrome and POR deficiency. *American Journal of Case Reports*. 2015; 16: 882–885.
67. Koolen DA, Pfundt R, Linda K, Beunders G, Veenstra-Knol HE, Conta JH, Fortuna AM, Gillissen-Kaesbach G, Dugan S, Halbach S, Abdul-Rahman OA, Winesett HM, Chung

- WK, Dalton M, Dimova PS, Mattina T, Prescott K, Zhang HZ, Saal HM, Hehir-Kwa JY, Willemsen MH, Ockeloen CW, Jongmans MC, Van der Aa N, Failla P, Barone C, Avola E, Brooks AS, Kant SG, Gerkes EH, Firth HV, Öunap K, Bird LM, Masser-Frye D, Friedman JR, Sokunbi MA, Dixit A, Splitt M; DDD Study, Kukolich MK, McGaughran J, Coe BP, Flórez J, Nadif Kasri N, Brunner HG, Thompson EM, Gecz J, Romano C, Eichler EE, de Vries BB. The Koolen-de Vries syndrome: a phenotypic comparison of patients with a 17q21.31 microdeletion versus a KANSL1 sequence variant. *Eur J Hum Genet.* 2016 May;24(5):652-9. doi: 10.1038/ejhg.2015.178.
68. Badve CA, K MM, Iyer RS, et al. Craniosynostosis: imaging review and primer on computed tomography. *Pediatr Radiol* 2013; 43:728–42; quiz 725–27. 10.1007/s00247-013-2673-6
69. Passos-Bueno M.R, Sertié A, Jehée FS, Fanganiello R, Yeh E, Genetics of Craniosynostosis: Genes, Syndromes, Mutations and Genotype-Phenotype Correlations. *Front Oral Biol.* Basel, Karger, 2008, 12: 107–143
70. Cunningham ML, Heike CL. Evaluation of the infant with an abnormal skull shape. *Curr Opin Pediatr* 2007; 19:645–51.10.1097/MOP.0b013e3282f1581a
71. Khanna PC, Thapa MM, Iyer RS, et al. Pictorial essay: The many faces of craniosynostosis. *Indian J Radiol Imaging* 2011; 21:49–56. 10.4103/0971-3026.76055
72. Pfeiffer RA. [Dominant Hereditary Acrocephalosyndactylia]. *Z Kinderheilkd.* 1964 Sep 16; 90:301-20. [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532882/>]
73. Becerra V, Hinojosa J, Alamar M, Martinez A, Casas D, Candela S. Turner syndrome and craniosynostosis: an unusual combination. *EMJ Neurol.* 2021;9[1]:72-76. DOI/10.33590/emjneuro/20-00240.
74. Glass RB, Fernbach SK, Norton KI, et al. The infant skull: a vault of information. *Radiographics.* 2004; 24:507–22.10.1148/rg.242035105
75. Justice CM, Yagnik G, Kim Y, et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for nonsyndromic sagittal craniosynostosis near BMP2 and within BBS9. *Nat Genet* 2012; 44:1360–64. 10.1038/ng.2463
76. Johnson D, Wilkie A. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19:369–76. 10.1038/ejhg.2010.235
77. Rothenbuhler A, Fadel N, Debza Y, Bacchetta J, Tidiane Diallo M, Adamsbaum C, Linglart A, Di Rocco F. High incidence of cranial synostosis and Chiari I malformation in children with X-linked Hypophosphatemic Rickets (XLHR). *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 33, 2018, 1-7

78. Murthy A.S, X-linked Hypophosphatemic rickets and craniosynostosis. *J Craniofac Surg* 2009;20: 439-442
79. Currarino G, Sagittal synostosis in X-linked hypophosphatemic rickets and related diseases. *Pediatr Radiol* 2007 37:805-812
80. Camera, G., Lituania, M., Cohen, M. M., Jr. Holoprosencephaly and primary craniosynostosis: the Genoa syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 47: 1161-1165, 1993.
81. Bessenyei B, Nagy A, Balogh E, Novák L, Bognár L, Knegt AC, Oláh E. Achondroplasia with multiple suture craniosynostosis: a report of a new case of this rare association. *Am J Med Genet A.* 2013 Oct;161A (10):2641-4. doi: 10.1002/ajmg.a.36130.
82. Di Rocco F, Baujat G, Cormier-Daire V, Rothenbuhler A, Linglart A. Craniosynostosis and hypophosphatasia. *Archives de Pediatrie* 2017 24:5589-5592
83. Di Rocco F, Rothenbuhler A, Cormier Daire V, Bacchetta J, Adamsbaum C, Baujat G, Rossi M, Lingart A. Craniosynostosis and metabolic bone disorder. A review. *Neurochirurgie.* 2019 Nov;65(5):258-263. doi: 10.1016/j.neuchi.2019.09.008. Epub 2019 Sep 25. PMID: 31562881.
84. Rahman S, Noujaim S.E., Chaiyasate K. Craniosynostosis: Diagnosis, Pitfalls, and Management. What the Radiologist Needs to Know. *Neurographics* 2017; 7(5):354–362
85. Goos J.A.C, Mathijssen I.M.J, Genetic Causes of Craniosynostosis: An Update. *Mol Syndromol*, Aug 2018, DOI: 10.1159/000492266
86. Flaherty K, Singh N, Richtsmeier J.T, Understanding craniosynostosis as a growth disorder. *WIREs Dev Biol* 2016, 5:429–459. doi: 10.1002/wdev.227
87. Moro'n FE, Morriss MC, Jones JJ. Lumps and bumps on the head in children: use of CT and MR imaging in solving the clinical diagnostic dilemma. *Radiographics* 2004; 24:1655–74. 10.1148/rg.246045034
88. Fearon JA. Evidence-based medicine: Craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg* 2014; 133:1261–75
89. Mundinger GS, Rehim SA, Johnson O III, et al. Distraction osteogenesis for surgical treatment of craniosynostosis: a systematic review. *Plast Reconstr Surg* 2016; 128:657–69.
90. Lin Y, Pan IW, Mayer RR, et al. Complications after craniosynostosis surgery: comparison of the 2012 Kids' Inpatient Database and Pediatric NSQIP Database. *Neurosurg Focus* 2015; 39: E11 10.3171/2015.9. FOCUS 15383
91. Lusk L, Vogel-Farley V, DiStefano C, Jeste S. Maternal 15q duplication syndrome. *GeneReviews* Jul 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK367946/>

92. Swanson JW, Samra F, Bauder A, et al. An algorithm for managing syndromic craniosynostosis using posterior vault distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2016; 137:829e– 41. doi: 10.1097/PRS.0000000000002127
93. Kimonis V, Gold JA, Hoffman TL, Panchal J, Boyadjiev SA. Genetics of craniosynostosis. *Semin Pediatr Neurol* 2007; 14: 150-61.
94. Delahaye S, Bernard JP, Rénier D, Ville Y. Prenatal ultrasound diagnosis of fetal craniosynostosis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; 21: 347-353.
95. Governale LS. Craniosynostosis. *Pediatr Neurol* 2015; 53:394-401.
96. Blaser SI, Padfield N, Chitayat D, Forrest CR. Skull base development and craniosynostosis. *Pediatr Radiol* 2015; 45 Suppl 3: 485-496.
97. Derderian C, Seaward J. Syndromic craniosynostosis. *Semin Plast Surg* 2012; 26: 64-75.
98. Ardalan M, Rafati A, Nejat F, Farazmand B, Majed M, El Khashab M. Risk factors associated with craniosynostosis: a case control study. *Pediatr Neurosurg* 2012; 48: 152-156.
99. Zollino M, Lattante S, Orteschi D, Frangella S, Doronzio PN, Contaldo I, Mercuri E and Marangi G. Syndromic Craniosynostosis Can Define New Candidate Genes for Suture Development or Result from the Non-specific Effects of Pleiotropic Genes: Rasopathies and Chromatinopathies as Examples. *Front. Neurosci.* 2017, 11:587. doi: 10.3389/fnins.2017.00587
100. Addissie YA, Kotecha U, Hart RA, Martinez AF, Kruszka P, Muenke M. Craniosynostosis and Noonan syndrome with KRAS mutations: Expanding the phenotype with a case report and review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 2015 167A:2657–2663.
101. Seemanova E, Sperling K, Neitzel H, Varon R, Hadac J, Butova O, Schrock E, Seeman P, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS) with neurological abnormalities and without chromosomal instability. *J Med Genet* 2019; 43:218–224. doi: 10.1136/jmg.2005.035287
102. Lovrecic L, Gnan C, Baldan F, Franzoni A, Bertok S, Damante G, Isidor B, Peterlin B. Microduplication in the 2p16.1p15 chromosomal region linked to developmental delay and intellectual disability. *Mol Cytogenet.* 2018 Jun 20; 11:39. doi: 10.1186/s13039-018-0388-y.
103. Martínez-Lage JF, Felipe-Murcia M, Navarro EG, Almagro MJ, López-Guerrero AL, Pérez-Espejo MA. Craniosynostosis in Kabuki syndrome. *J Neurosurg Pediatr.* 2010 Aug;6(2):198-201. doi: 10.3171/2010.5. PEDS09286. PMID: 20672944.

104. Topa A, Samuelsson L, Lovmar L, Stenman G, Kölby L. On the significance of craniosynostosis in a case of Kabuki syndrome with a concomitant KMT2D mutation and 3.2 Mbp de novo 10q22.3q23.1 deletion. *Am J Med Genet A*. 2017 Aug;173(8):2219-2225. doi: 10.1002/ajmg.a.38296. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28590022.
105. Siu A, Rogers G, Myseros J, Khalsa S, Keating R, Magge S. Unilateral coronal craniosynostosis and Down syndrome. Report of two cases. *J Neurosurg Pediatrics* 2014 13:568–571
106. Kapp-Simon KA, Collett BR, Barr-Schinzel MA, Craddock MM, Buono LA, Pietila KE, Speltz ML. Behavioral adjustment of toddler and preschool-aged children with single-suture craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*. 2012 Sep;130(3):635-647. doi: 10.1097/PRS.0b013e31825dc18b. PMID: 22929249; PMCID: PMC3431507.
107. Oussoren E, Mathijssen I, Wagenmakers M, Verdijk R, Bredero-Boelhouwer H, van Veelen-Vincent M, van der Meijden C, van den Hout J, Ruijter G, van der Ploeg A, Langeveld M. Craniosynostosis affects the majority of mucopolysaccharidosis patients and can contribute to increased intracranial pressure. *Journal of Inherited Metabolic Disease* (2018) 41:1247–1258
108. Wang H, Falk M.J, Wensel C, Traboulsi E. Cohen Syndrome. *GeneReviews* Jul 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1482>
109. Twigg S., Forecki J. et al. “Gain-of-Function Mutations in *ZIC1* Are Associated with Coronal Craniosynostosis and Learning Disability”, *AHJG*, VOLUME 97, ISSUE 3, P378-388, SEPTEMBER 03, 2015, DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.07.007>
110. Vandervore L., Schot R. et al. “Mutated zinc finger protein of the cerebellum 1 leads to microcephaly, cortical malformation, callosal agenesis, cerebellar dysplasia, tethered cord and scoliosis”, *European Journal of Medical Genetics*, Volume 61, Issue 12, December 2018, Pages 783-789, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.10.018>
111. Faro C, Benoit B, Wegrzyn P, Chaoui R, Nicolaidis KH. Three-dimensional sonographic description of the fetal frontal bones and metopic suture. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005; 26: 618-621.
112. Vandervore L.V, Schot R, Hoogeboom A.J, Lincke C, de Coo I.F, Lequin M.H, Dremmen M, van Unen L, Saris J.J, Jansen A, van Slegtenhorst A, Wilke M, Mancini G. Mutated zinc finger protein of the cerebellum 1 leads to microcephaly, cortical malformation, callosal agenesis, cerebellar dysplasia, tethered cord and scoliosis. *European Journal of Medical Genetics* 2018, Vol. 61, (12): 783-789, ISSN 1769-7212, <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2018.10.018>.

113. Atli Emine I, Sinem Y, Engin A, Selma D, Cisem M, Damla E, Rasime K, Hakan G. A Pilot Study of Identification Genetic Background of Craniosynostosis Cases. *Journal of Craniofacial Surgery*: May 2021 - Volume 32 - Issue 3 - p 1059-1062 doi: 10.1097/SCS.00000000000007285
114. Ylstra B, van P, den Ijssel, B, Carvalho, R, Brakenhoff, G, Meijer. BAC to the future! Or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). *Nucleic Acids Res*, 34(2), 2006, 445-50.
115. Ishkanian A.S., C.A. Mallof, S.K. Watson, R. J. De Leeuw, B. Chi, B. P. Coe, A. Snijders, D. G. Albertson, D. Pinkel, M. A. Marra, V. Ling, C. MacAulay, W. L. Lam. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet*, 36(3), 2004, 299-303.
116. Shaikh T.H. Oligonucleotide arrays for high-resolution analysis of copy number alteration in mental retardation/multiple congenital anomalies. *Genet Med*. 9(9), 2007, 617-25.
117. Shaffer L.G, T.H. Bui. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 145C (1), 2007, 87-98.
118. Shaffer, L.G. Risk estimates for uniparental disomy following prenatal detection of a nonhomologous Robertsonian translocation. *Prenat Diagn*. 26(4), 2006, 303-7.
119. Kitsiou-Tzeli S., C. Sismani, M. Karkaletsis, L. Florentin, A. Anastassiou, G. Koumbaris, P. Enangelidou, E. Agapitos, P.C. Patsalis, V. Velissariou. Prenatal diagnosis of a de novo partial trisomy 10p12.1-12.2 pter originating from an unbalanced translocation onto 15qter and confirmed with array CGH. *Prenat Diagn*, 28(8), 2008, 770-2.
120. Toruner G.A., D.L. Streck, M.N. Schwalb, J.J. Dermody. An oligonucleotide-based array-CGH system for detection of genome wide copy number changes including subtelomeric regions for genetic evaluation of mental retardation. *Am J Med Genet A*, 143A (8), 2007, 824-9.
121. Veltman, J.A. B.B. de Vries. Whole-genome array comparative genome hybridization: the preferred diagnostic choice in postnatal clinical cytogenetics. *J Mol Diagn*. 9(2), 2007, 277.
122. Baldwin, E.L., J.Y. Lee, D.M. Blake, B.P. Bunke, C.R. Alexander, A.L. Kogan., D.H. Ledbetter, C.L. Martin. Enhanced detection of clinically relevant genomic imbalances using a targeted plus whole genome oligonucleotide microarray. *Genet Med*, 10(6), 2008, 415-29.
123. Wong L.J., D. Dimmock, M. Geraghty, R. Quan, U. Lichter-Konecki, J. Wang, E. Brundage, F. Scaglia, A.C. Chinault. Utility of oligonucleotide array-based comparative

- genomic hybridization for detection of target gene deletions. *Clin Chem.* 54(7), 2008, 1141-8.
124. Brennan C., Y. Zhang, C. Leo, B. Feng, C. Cauwels, A.J. Aguirre, M. Kim, A. Protopopov, L. Chin, High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res.* 64(14), 2004, 4744-4748.
125. Dhami P., A.J. Coffey, S. Abbs, J.R. Vermeesch, J.P. Dumanski, K.J. Woodward, R.M. Andrews, C. Langford, D. Vetrie, Exon array CGH: detection of copy number changes at the resolution of individual exons in the human genome. *Am.J.Hum.Genet.* 76(5), 2005, 750-762.
126. Rosenberg C., J. Knijneburg, E. Bakker, A.M. Vianna-Morgante, W. Sloos, P. A. Otto, M. Kriek et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances presents both affected children and normal parents. *J.Med.Genet.* 43(2), 2006, 180-186
127. Ah Mew N, Simpson KL, Gropman AL, et al. Urea Cycle Disorders Overview. 2003 Apr 29 [Updated 2017 Jun 22]. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1217/>
128. Shaw-Smith C., R. Redon, L. Rickman, M. Rio, L. Willatt, H. Fiegler, H. Firth, D. Sanlaville, R. Winter, L. Colleaux, M. Bobrow, N.P. Carter . Microarray based comparative genomic hybridization (array-CHG) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J.Med.Genet.* 41(4), 2004, 241-248
129. Shoumans J., C. Ruivenkamp, E. Holmberg, M. Kyllerman, B.M. Anderlid, M. Nordenskjöld. Detection of chromosomal imbalances in children with idiopathic mental retardation by array based comparative genomic hybridization (array-CGH). *J.Med.Genet.* 42(9), 2005, 699-705
130. Hadjidekova S., B. Rukova, D. Avdjieva-Tzavella, D. Nesheva, R. Tincheva, D. Toncheva. Comparison of two microarray CGH platforms for genomewide copy number profilings: oligo-based arrays versus bacterial artificial chromosome arrays. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 25(3), 2011, 2499-2504
131. Vissers L.E., C.M. van Ravenswaaij, R. Admiraal, J. A. Hurst, B. B. de Vries, I.M. Janssen, W. A. van der Vliet, E.H. Huys, P. J. de Jong, B.C. Hamel, E. F. Schoenmakers, H.G. Brunner, J.A. Veltman, A. G. van Kessel. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 36(9), 2004, 955-7.

132. Ooslander A.E., G Meijer, B. Ylstra. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin. Genet.* 66(6), 2004, 488-495.
133. Bielanska, M., S.L. Tan, A. Ao, Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod*, 17(2): 2002, 413-9.
134. Ballif, B.C., E.A. Rorem, K. Sundin, M. Lincim, S. Gaskin, J. Coppinger, C.D. Kashork, L.G. Shaffer, B.A. Bejjani. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A*, 140(24), 2006, 2757-67.
135. Cheung, S.W., C.A. Shaw, D.A. Scott, A. Patel, T. Sahoo, C.A. Bacino, A. Pursley, J. Li, R. Erickson, A.L. Gropman, D.T. Miller, M.R. Seashore, A.M. Summers, P. Stankiewicz, A.C. Chinault, J.R. Lupski, A.L. Beaudet, V.R. Sutton, Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. *Am J Med Genet A*, 143A (15), 2007, 1679- 86.
136. Tuzun E., A.J. Sharp, J.A. Bailey, R. Kaul, V.A. Morrison, L.M. Pertz, E. Haugen, H. Hayden, D. Albertson, D. Pinkel, M.V. Olson, E.E. Eichler. Fine-scale structural variation of the human genome. *Nat.Genet.* 37(7), 2005, 727-732.
137. van Ommen, G.J. Frequency of new copy number variation in humans. *Nat.Genet.* 37(4), 2005, 333-334.
138. Kondrashov A. S. Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Hum.Mutat.* 21(1), 2003, 12-27.
139. Cytrynbaum C.S., A.C. Smith, T. Rubin, S. Weksberg. Advances in overgrowth syndromes: clinical classification to molecular delineation in Sotos syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 17(6), 2005, 740-6.
140. Linardopoulou E.V., E.M. Williams, Y. Fan, C. Friedman, J.M. Young, B.J. Trask. Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* 437(7055), 2005, 94-100.
141. Armengol L., M.A. Pujana, J. Cheung, S.W. Scherer, X. Estivill, Enrichment of segmental duplications in regions of breaks of synteny between the human and mouse genomes suggest their involvement in evolutionary rearrangements. *Hum.Mol.Genet.* 12(17), 2003, 2201-2208.
142. Sharp A.J., D.P. Locke, S.D. McGrath, Z. Cheng, J.A. Bailey, R.U. Vallente, L.M. Pertz, R.A. Clark, S. Schwartz, R. Segraves, V.V. Oseroff, D.G. Albertson, D. Pinkel, E.E. Eichler. Segmental duplications and copy-number variation in the human genome. *Am.J.Hum.Genet.* 77(1), 2005, 78-88.

143. Klein O.D., P.D. Cotter, D.G. Albertson, D. Pinkel, W.E. Tidyman, et al. Prader-Willi syndrome resulting from an unbalanced translocation: characterization by array comparative genomic hybridization. *Clin. Genet.* 65(6), 2004, 477–82
144. Tyson C., B. McGillivray, C. Chijiwa, E. Rajcan-Separovic. Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH. *Am. J. Med. Genet.* 129A (3) 2004, 254–60
145. Gribble S.M., E. Prigmore, D.C. Burford, K.M. Porter, B.L. Ng, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. *J. Med. Genet.* 42(1), 2005, 8–16
146. Sebat J., B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. - *Science.* 305(5683), 2004, 525-528.
147. Sebat J., B. Lakshmi, D. Malhotra, J. Troge, C. Lese-Martin, T. Walsh, B. Yamrom et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316(5823), 2007, 445-9.
148. Iafrate A.J., L. Feuk, M.N. Rivera, M.L. Listewnik, P.K. Donahoe, Y. Qi, S.W. Scherer, C. Lee. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 36(9), 2004, 949-951.
149. Conrad D.F., T.D. Andrews, N.P. Carter, M. E. Hurles, J. K. Pritchard, A high resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. *Nat. Genet.* 38(1), 2006, 75-81.
150. Siwach, P., S. Ganesh. Tandem repeats in human disorders: mechanisms and evolution. *Front Biosci.* 13, 2008, 4467-4484.
151. Gimelli G., M.A. Pujana, M.G. Patricelli, S. Russo, D. Giardino, L. Larizza, J. Cheung, L. Armengol, A. Schinzel, X. Estivill, O. Zuffardi. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum. Mol. Genet.* 12(8), 2003, 849-858.
152. Barber, J.C. Directly transmitted unbalanced chromosome abnormalities and euchromatic variants. *J. Med. Genet.* 42(8), 2005, 609-629.
153. Walsh T., J. M. McClellan, S.E. McCarthy, S.B. Pierce, A.M. Addington, G.M. Cooper, A.S. Nord et al., Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science.* 320(5875), 2008, 539-43.
154. Stefansson H., Rujescu D, Cichon S, Pietiläinen O, Ingason A, Steinberg A, Fossdal R. et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455(7210), 2008, 232-6.

155. Friedman J.M., A. Baross, A.D. Delaney, A. Ally, L. Arbour, L. Armstrong, J. Asano, D.K. Bailey, S. Barber, P. Birch et al.: Oligonucleotide microarray analysis of genomic imbalance in children with mental retardation. *Am J Hum Genet*, 79(3), 2006, 500-13.
156. Wagenstaller J., Lorenz-Depiereux B, Kazmierczak B, Nathrath M, Wahl D, Heye B, Glaser D, Liebscher V, Meitinger T, T.M. Strom. Copy-number variations measured by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide arrays in patients with mental retardation. *Am J Hum Genet*. 81(4), 2007, 768-79.
157. Korb J. O., A.E. Urban, J.P. Affourtit, B. Godwin, F. Grubert, J. F. Simons, P.M. Kim, D. Palejev, N. J. Carriero, L. Du, B.E. Taillon, Z. Chen, A. Tanzer, A.C. Saunders, J. Chi, F. Yang, N. P. Carter, M.E. Hurles, S.M. Weissman, T. T. Harkins, M. B. Gerstein, M. Egholm, M. Snyder. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science*, 318(5849), 2007, 420-6.
158. Perry G.H., F. Yang, T. Marques-Bonet, C. Murphy, T. Fitzgerald, A.S. Lee, C. Hyland, A.C. Stone, M.E. Hurles, C. Tyler-Smith, E.E. Eichler, N.P. Carter, C. Lee, R. Redon. Copy number variation and evolution in humans and chimpanzees. *Genome Res*, 18(11), 2008, 1698-710.
159. Koolen D.A., R. Pfundt, N. de Leeuw, J.Y. Hehir-Kwa, W.M. Nillesen, I. Neefs, I. Scheltinga, E. Sistermans, D. Smeets, H.G. Brunner, A.G. van Kessel, J.A. Veltman, B.B. de Vries. Genomic microarrays in mental retardation: a practical workflow for diagnostic applications. *Hum Mutat*, 30(3), 2009, 283-92.
160. McMullan D.J., M. Bonin, J.Y. Hehir-Kwa, B.B.A. de Vries, A. Dufke, E. Rattenberry, M. Steehouwer, L. Moruz, R. Pfundt, N. de Lee, et al: Molecular karyotyping of patients with unexplained mental retardation by SNP arrays: a multicenter study. *Hum Mutat*, 30(7), 2009, 1082-92.
161. Firth H.V., S.M. Richards, A.P. Bevan, S. Clayton, M. Corpas, D. Rajan, S. Van Vooren, Y. Moreau, R.M. Pettett, N.P. Carter. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet*, 84(4), 2009, 524-33.
162. Rosenberg C., J. Knijnenburg, E. Bakker, A.M. Vianna-Morgante, W. Sloos, P. A. Otto, M. Kriek et al. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances presents both affected children and normal parents. *J. Med. Genet*. 43(2), 2006, 180-186

163. Brunetti-Pierri N, Berg JS, Scaglia F, Belmont J, Bacino CA, Sahoo T, Lalani SR, Graham B, Lee B, Shinawi M, Shen J, Kang SH, Pursley A, Lotze T, Kennedy G, Lansky-Shafer S, Weaver C, Roeder ER, Grebe TA, Arnold GL, Hutchison T, Reimschisel T, Amato S, Geraghty MT, Innis JW, Obersztyn E, Nowakowska B, Rosengren SS, Bader PI, Grange DK, Naqvi S, Garnica AD, Bernes SM, Fong CT, Summers A, Walters WD, Lupski JR, Stankiewicz P, Cheung SW, Patel A. Recurrent reciprocal 1q21.1 deletions and duplications associated with microcephaly or macrocephaly and developmental and behavioral abnormalities. *Nat Genet.* 2008 Dec;40(12):1466-71. doi: 10.1038/ng.279.
164. Rosenfeld JA, Traylor RN, Schaefer GB, McPherson EW, Ballif BC, Klopocki E, Mundlos S, Shaffer LG, Aylsworth AS; 1q21.1 Study Group. Proximal microdeletions and microduplications of 1q21.1 contribute to variable abnormal phenotypes. *Eur J Hum Genet.* 2012 Jul;20(7):754-61. doi: 10.1038/ejhg.2012.6.
165. Swanson J, Oppenheimer A, Al-Mufarrej F, et al. Maternofetal Trauma in Craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg* 2015; 136: 214e-222e.
166. Huber RS, Houlihan D, Filter K. Dubowitz syndrome: a review and implications for cognitive, behavioral, and psychological features. *J Clin Med Res.* 2011 Jul 26;3(4):147-55. doi: 10.4021/jocmr581w.
167. Brisset S, Capri Y, Briand-Suleau A, Tosca L, Gras D, Fauret-Amsellem AL, Pineau D, Saada J, Ortonne V, Verloes A, Goossens M, Tachdjian G, Métoy C. Inherited 1q21.1q21.2 duplication and 16p11.2 deletion: a two-hit case with more severe clinical manifestations. *Eur J Med Genet.* 2015 Sep;58(9):497-501. doi: 10.1016/j.ejmg.2015.07.001.
168. Youngs EL, Hellings JA, Butler MG. A clinical report and further delineation of the 14q32 deletion syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2011 Jul;20(3):143-147. doi: 10.1097/MCD.0b013e3283438200
169. Chen CP, Su YN, Hsu CY, et al. Second-trimester molecular prenatal diagnosis of sporadic Apert syndrome following sonographic findings of mild ventriculomegaly and clenched hands mimicking trisomy 18. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2010; 49: 129-132.
170. Stark Z, McGillivray G, Sampson A, et al. Apert syndrome: temporal lobe abnormalities on fetal brain imaging. *Prenat Diagn* 2015; 35: 179-182.
171. Zollino M, Marangi G, Ponzi E, Orteschi D, Ricciardi S, Lattante S, Murdolo M, Battaglia D, Contaldo I, Mercuri E, Stefanini C, Caumes R, Patrick E, Rossi M, Maria P, Corsello G et al. Intragenic KANSL1 mutations and chromosome 17q21.31 deletions: broadening the clinical spectrum and genotype–phenotype correlations in a large cohort of patients. *J Med Genet* 2015; 0:1–11. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103184.

172. Hidestrand P, Vasconez H, Cottrill C. Carpenter syndrome. *J Craniofac Surg*. 2009 Jan;20(1):254-6. doi: 10.1097/SCS.0b013e318184357a. PMID: 19165041.
173. Alessandri JL, Dagoneau N, Laville JM, Baruteau J, Hébert JC, Cormier-Daire V. RAB23 mutation in a large family from Comoros Islands with Carpenter syndrome. *Am J Med Genet A*. 2010 Apr;152A (4):982-6. doi: 10.1002/ajmg.a.33327.
174. Perlyn CA, Marsh JL. Craniofacial dysmorphology of Carpenter syndrome: lessons from three affected siblings. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Mar;121(3):971-981. doi: 10.1097/01.prs.0000299284.92862.6c.
175. Hufnagel RB, Zimmerman SL, Krueger LA, Bender PL, Ahmed ZM, Saal HM. A new frontonasal dysplasia syndrome associated with deletion of the SIX2 gene. *Am J Med Genet A*. 2016 Feb;170A (2):487-491. doi: 10.1002/ajmg.a.37441
176. Haye D, Collet C, Sembely-Taveau C, et al. Prenatal findings in carpenter syndrome and a novel mutation in RAB23. *Am J Med Genet A* 2014; 164A: 2926-2930.
177. Morris C.A. Williams Syndrome. *GeneReviews* March 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1249/>
178. Lam H, Lo T-KK, Lau E, Chin R, Tang L. The use of 2- and 3-dimensional sonographic scans in the evaluation of cranial sutures: prenatal diagnosis of Apert syndrome. *J Ultrasound Med* 2006; 25: 148-1484.
179. Esser T, Rogalla P, Bamberg C, Kalache KD. Application of the three-dimensional maximum mode in prenatal diagnosis of Apert syndrome. *Am J Obs Gynecol* 2005; 193:1743-1745.
180. Faro C, Chaoui R, Wegrzyn P, Levailant JM, Benoit B, Nicolaides KH. Metopic suture in fetuses with Apert syndrome at 22-27 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2006; 27:28-33.
181. Nørgaard P, Hagen CP, Hove H, et al. Crouzon syndrome associated with acanthosis nigricans: prenatal 2D and 3D ultrasound findings and postnatal 3D CT findings. *Acta Radiol short reports* 2012; 1:1-5.
182. Medina M, Cortes E, Eguiluz I, Barber MA. Three-dimensional features of Pfeiffer syndrome. *Int J Gynaecol Obs* 2009; 105: 266-267
183. Das J.M, Winters R. Pfeiffer Syndrome. *GeneReviews* Jul 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532882/>
184. David AL, Turnbull C, Scott R, et al. Diagnosis of Apert syndrome in the second trimester using 2D and 3D ultrasound. *Prenat Diagn* 2007; 27: 629-632.

185. Giancotti A, D'Ambrosio V, De Filippis A, et al. Comparison of ultrasound and magnetic resonance imaging in the prenatal diagnosis of Apert syndrome: Report of a case. *Child's Nerv Syst* 2014; 30: 1445-1448.
186. Quintero-Rivera F, Robson CD, Reiss RE, et al. Apert syndrome: what prenatal radiographic findings should prompt its consideration? *Prenat Diagn* 2006; 26: 966-972.
187. Itoh S, Nojima M, Yoshida K. Usefulness of magnetic resonance imaging for accurate diagnosis of Pfeiffer syndrome type II in utero. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21: 168-171.
188. Mahieu-Caputo D, Sonigo P, et al. Prenatal diagnosis of sporadic Apert syndrome: a sequential diagnostic approach combining three-dimensional computed tomography and molecular biology. *Fetal Diagn Ther* 2001; 16: 10-12.
189. Athanasiadis AP, Zafrakas M, Polychronou P, et al. Apert syndrome: the current role of prenatal ultrasound and genetic analysis in diagnosis and counselling. *Fetal Diagn Ther* 2008; 24: 495-498.
190. Spaggiari E, Aboura A, Sinico M, et al. Prenatal diagnosis of a 7p15-p21 deletion encompassing the TWIST1 gene involved in Saethre-Chotzen syndrome. *Eur J Med Genet* 2012; 55: 498-501.
191. Wilkie AOM, Bochukova EG, Hansen RMS, et al. Clinical dividends from the molecular genetic diagnosis of craniosynostosis. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 1941-1949.
192. Galbiati S, Stenirri S, Sbaiz L, et al. Identification of an 18 bp deletion in the TWIST1 gene by CO-amplification at lower denaturation temperature-PCR (COLD-PCR) for non-invasive prenatal diagnosis of craniosynostosis: first case report. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 505-509.
193. Nazzaro A, Della Monica M, Lonardo F, et al. Prenatal ultrasound diagnosis of a case of Pfeiffer syndrome without cloverleaf skull and review of the literature. *Prenat Diagn* 2004; 24: 918-922.
194. Moes-Sosnowska J, Chorostowska-Wynimko J. Fibroblast Growth Factor Receptor 1-4 Genetic Aberrations as Clinically Relevant Biomarkers in Squamous Cell Lung Cancer. *Front Oncol*. 2022 Mar 25; 12:780650. doi: 10.3389/fonc.2022.780650.
195. Chen CP, Huang HK, Liu YP, Chern SR, Su JW, Wang W. Pfeiffer syndrome with FGFR2 W290C mutation perinatally presenting extreme proptosis. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2013; 52: 607-610.
196. Nieuwenhuyzen-De Boer GM, Hoogeboom AJM, Smit LS, Heydanus R, Eggink AJ. Pfeiffer syndrome: the importance of prenatal diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014; 181: 339-340.

197. Johnson D, Wilkie AO. Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 369-376.
198. Ben Hamouda H, Tlili Y, Ghanmi S, et al. Pfeiffer syndrome type II discovered perinatally: Report of an observation and review of the literature. *Diagn Interv Imaging* 2012; 93: 785-789.
199. Arnaud-Lopez L, Fragoso R, Mantilla-Capacho J, et al. Crouzon with acanthosis nigricans: further delineation of the syndrome. *Clin Genet* 2007; 72: 405-410.
200. Massalska D, Bijok J, Kucińska-Chahwan A, et al. Prenatal diagnosis of craniosynostosis (compound Saethre-Chotzen syndrome phenotype) caused by a de novo complex chromosomal rearrangement (1; 4; 7) with a microdeletion of 7p21.3-7p15.3, including TWIST1 gene--a case report. *Ginekol Pol* 2014; 85: 541-544.
201. Shaw A, Petersen OB, Chitty LS. Prenatal diagnosis of craniosynostosis: sonographic features of Muenke syndrome. *J Obstet Gynaecol* 2011; 31:770-771.
202. Gebb J, Demasio K, Dar P. Prenatal sonographic diagnosis of familial Saethre-Chotzen syndrome. *J Ultrasound Med* 2011; 30: 420-422.
203. Renier O, Lajeunie E, Arnaud E, Marchac D. Management of craniosynostoses. *Childs Nerv Syst* 2000; 16:645-658.
204. Abu-Sittah GS, Jeelani O, Dunaway D, Hayward R: Raised intracranial pressure in Crouzon syndrome: incidence, causes, and management. *J Neurosurg Pediatr* (2016) 17: 469–475.
205. Agochukwu NB, Solomon BD, Muenke M: Impact of genetics on the diagnosis and clinical management of syndromic craniosynostoses. *Childs Nerv Syst* (2012a) 28: 1447–1463.
206. Agochukwu NB, Solomon BD, Gropman AL, Muenke M: Epilepsy in Muenke syndrome: *FGFR3*-related craniosynostosis. *Pediatr Neurol* (2012b) 47: 355–361.
207. Derrick C. Wana,b, Matthew D. Kwana,c, H. Peter Lorenza , Michael T. Longakera, Current Treatment of Craniosynostosis and Future Therapeutic Directions. *Front Oral Biol. Basel, Karger, 2008, 12: 209–230*
208. Rice D.P, Clinical Features of Syndromic Craniosynostosis, *Front Oral Biol. Basel, Karger, 2008, 12: 91-106*
209. Edelmann, L., K. Hirschhorn, Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*, 1151, 2009, 157-66.
210. Wentzel C, Fernström M, Ohrner Y, Annerén G, Thuresson AC. Clinical variability of the 22q11.2 duplication syndrome. *Eur J Med Genet.* 2008 Nov-Dec;51(6):501-10. doi: 10.1016/j.ejmg.2008.07.005.

211. Kylat RI. 22q11.2 Microduplication: An Enigmatic Genetic Disorder. *J Pediatr Genet*. 2018 Sep;7(3):138-142. doi: 10.1055/s-0038-1655754.
212. Britto JA, Chan JC, Evans RD, Hayward RD, Jones BM: Differential expression of fibroblast growth factor receptors in human digital development suggests common pathogenesis in complex acrosyndactyly and craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg* (2001) 107: 1331–1338.
213. Sloan J.L, Carrillo N, Adams D, Venditti C.P. Disorders of intracellular cobalamin metabolism. *GeneReviews* 2021 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1328/>
214. Cho E, Yang TH, Shin ES, Byeon JH, Kim GH, Eun BL: Saethre–Chotzen syndrome with an atypical phenotype: identification of *TWIST* microdeletion by array CGH. *Childs Nerv Syst* (2013) 29: 2101–2104.
215. Crombag GA, Verdoorn MH, Nikkhah D, Ponniah AJ, Ruff C, Dunaway D: Assessing the corrective effects of facial bipartition distraction in Apert syndrome using geometric morphometrics. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* (2014) 67: e151–161.
216. de Jong T, Bannink N, Bredero-Boelhouwer HH, van Veelen ML, Bartels MC, et al: Long-term functional outcome in 167 patients with syndromic craniosynostosis; defining a syndrome-specific risk profile. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* (2010) 63: 1635–1641.
217. de Jong T, van Veelen ML, Mathijssen IM: Springassisted posterior vault expansion in multisuture craniosynostosis. *Childs Nerv Syst* (2013) 29: 815–820.
218. Di Rocco F, Collet C, Legeai-Mallet L, Arnaud E, Le Merrer M. et al: Crouzon syndrome with acanthosis nigricans: a case-based update. *Childs Nerv Syst* (2011) 27: 349–354.
219. Di Rocco F, Baujat G, Arnaud E, Rñnier D, Laplanche JL, et al: Clinical spectrum and outcomes in families with coronal synostosis and *TCF12* mutations. *Eur J Hum Genet* (2014) 22: 1413– 1416.
220. Doherty ES, Lachawan F, Hadley DW, Brewer C, Zalewski C, et al: Muenke syndrome (FGFR3-related craniosynostosis): expansion of the phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet A* (2007) 143A:3204–3215.
221. Forrest CR, Hopper RA: Craniofacial syndromes and surgery. *Plast Reconstr Surg* (2013)131: 86e–109e.
222. Glaser RL, Jiang W, Boyadjiev SA, Tran AK, Zachary AA, et al: Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndrome and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet* 2000, 66: 768–777.

223. O'Hara J, Ruggiero F, Wilson L, James G, Glass G, Jeelani O, Bowman R, Robert W, Martin E, Hayward R, Dunaway D. Syndromic Craniosynostosis: Complexities of Clinical Care. *Mol Syndromol* 2019; 10:79–93. *Mol Syndromol* 2019; 10:79–93
224. Goos JA, Fenwick AL, Swagemakers SM, Mc-Gowan SJ, Knight SJ, et al: Identification of intragenic exon deletions and duplication of *TCF12* by whole genome or targeted sequencing as a cause of TCF12-related craniosynostosis. *Human Mutat* (2016) 37: 732–736.
225. Greig AV, Wagner J, Warren SM, Grayson B, Mc-Carthy JG: Pfeiffer syndrome: analysis of a clinical series and development of a classification system. *J Craniofac Surg* (2013)24: 204–215.
226. Johnson D, Wilkie AO: Craniosynostosis. *Eur J Hum Genet* (2011) 19: 369–376.
227. Kawamoto HK, Heller JB, Heller MM, Urrego A, Gabbay JS, et al: Craniofrontonasal dysplasia: a surgical treatment algorithm. *Plast Reconstr Surg* (2007) 120: 1943–1956.
228. Khonsari RH, Way B, Nysju J, Odri GA, Olszewski R, et al: Fronto-facial advancement and bipartition in Crouzon-Pfeiffer and Apert syndromes: impact of fronto-facial surgery upon orbital and airway parameters in FGFR2 syndromes. *J Craniomaxillofac Surg* (2016) 44: 1567–1575.
229. Kruszka P, Addissie YA, Yarnell CM, Hadley DW, Guillen Sacoto MJ, et al: Muenke syndrome: an international multicenter natural history study. *Am J Med Genet* (2016) A 170A:918–929.
230. Kruszka P, Addissie Y, Agochukwu N, Doherty E, Muenke M. Muenke Syndrome. *GeneReviews*, Nov 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1415/>
231. Marucci DD, Dunaway DJ, Jones BM, Hayward RD: Raised intracranial pressure in Apert syndrome. *Plast Reconstr Surg* (2008) 122: 1162–1168.
232. Sargar KM, Singh AK, Kao SC. Imaging of Skeletal Disorders Caused by Fibroblast Growth Factor Receptor Gene Mutations. *Radiographics*. 2017 Oct;37(6):1813-1830. doi: 10.1148/rg.2017170017
233. Raposo-Amaral CE, Neto JG, Denadai R, Raposo- Amaral CM, Raposo-Amaral CA: Patient reported quality of life in highest-functioning Apert and Crouzon Syndromes. *Plast Reconstr Surg* (2014) 133: 182e–191e.
234. Renier D, Lajeunie E, Arnaud E, Marchac D: Management of craniosynostoses. *Childs Nerv Sys* (2000) 16: 645–658.
235. Rice DP: Clinical features of syndromic craniosynostosis. *Front Oral Biol* (2008) 12: 91–106.

236. Spruijt B, Rijken BF, den Ottelander BK, Joosten KF, Lequin MH, et al: First vault expansion in Apert and Crouzon-Pfeiffer syndromes: front or back? *Plast Reconstr Surg* (2016)137: 112e–121e.
237. Conrady C.D, Patel B.C, Crouzon Syndrome, GeneReviews, Aug. 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518998/>
238. Taylor WJ, Hayward RD, Lasjaunias P, Britto JA, Thompson DN, et al: Enigma of raised intracranial pressure in patients with complex craniosynostosis: the role of abnormal intracranial venous drainage. *J Neurosurg* (2001) 94: 377–385.
239. Tovetjarn R, Tarnow P, Maltese G, Fischer S, Sahlin PE, Kulby L: Children with Apert syndrome as adults: a follow-up study of 28 Scandinavian patients. *Plast Reconstr Surg* (2012) 130: 572e–576e.
240. Kunwar F, Tewari S, Bakshi SR. Apert syndrome with S252W FGFR2 mutation and characterization using Phenomizer: An Indian case report. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2017 Jan-Apr;7(1):67-71. doi: 10.1016/j.jobcr.2016.07.002.
241. Conrady C.D, Patel B.C, Sharma S, Apert Syndrome, GeneReviews, Aug 2022, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK518993/>
242. Twigg SR, Wilkie AO: A genetic-pathophysiological framework for craniosynostosis. *Am J Hum Genet* (2015) 97: 359–377.
243. Twigg SR, Vorgia E, McGowan SJ, Peraki I, Fenwick AL, et al: Reduced dosage of ERF causes complex craniosynostosis in humans and mice and links ERK1/2 signaling to regulation of osteogenesis. *Nat Genet* (2013) 45: 308–313.
244. van den Elzen ME, Twigg SR, Goos JA, Hoogeboom AJ, van den Ouweland AM, et al: Phenotypes of craniofrontonasal syndrome in patients with a pathogenic mutation in *EFNB1*. *Eur J Hum Genet* (2014). 22: 995–1001
245. Wang JC, Nagy L, Demke JC: Syndromic craniosynostosis. *Facial Plast Surg Clin North Am* (2016) 24: 531–543.
246. Wilkie AM, Johnson D, Wall SA: Clinical genetics of craniosynostosis. *Curr Opin Pediatr* (2017) 29: 622–628.

X. ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че всички представени данни в настоящия дисертационен труд са от собствени изследвания и резултатите, обсъжданията и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:

гр. София

Подпис:

/Траян Делчев/