**МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ-
СОФИЯ,
КАТЕДРА ПО ПЕДИАТРИЯ**

Д-р Траян Недялков Делчев

Генетична и клинична характеристика на пациенти с краниосиностоза

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд 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

НАУЧНО ЖУРИ В СЪСТАВ:

Проф. д-р Стефан Недев Стефанов, д.м.

Доц. д-р Ралица Вилсон Георгиева, д.м.

Проф. д-р Вили Кръстева Стоянова, д.м.

Доц. д-р Йорданка Георгиева Узунова, д.м.

Доц. д-р Радослава Василева Въжарова, д.м.

София, 2022 г.

Изследванията са извършени в Отделение по клинична генетика, СБАЛДБ-ЕАД „Проф. Иван Митев”, Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София; Национална Генетична Лаборатория – СБАЛАГ Майчин дом; Цитогенетична лаборатория към СБАЛДБ-ЕАД „Проф. Иван Митев“

Дисертацията съдържа 191 стандартни страници и включва 47 фигури, 10 таблици и 4 приложения. Оформена е в 10 глави – увод, литературен обзор, цел и задачи, методи и материали, резултати и обсъждане, изводи, приноси, приложения, литературни източници и декларация за оригиналност. Библиографията обхваща 246 източника, сред които 4 са на български език, 1 на немски език и 241 на анлглийски език. 147 от източниците са публикувани през последните 10 години.

Авторът е задочен докторант към Катедра по Педиатрия, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по педиатрия към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 17.11.2022 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Педиатрия, 4-ти етаж на СБАЛДБ, ул. „Академик Иван Гешов ” №11, София, 1606.

Защитата ще се състои на 16.02.2023 год. от 13:30 часа в залата на СБАЛДБ „Проф. д-р Иван Митев”.

Автор: д-р Траян Недялков Делчев

Заглавие: Клинични и генетични характеристики на деца с краниосиностоза.

Област на висше образование: „Здравеопазване и спорт”, шифър 7.

Професионално направление: „Медицина”, шифър 7.1.

Научна специалност: „Педиатрия”, (шифър 03.01.50)

*Броят и поредният номер на таблиците и фигурите в автореферата не отговаря на тези в пълния текст на дисертацията!

Съдържание

Списък на съкращенията 5

1. Съкращения на кирилица: 5
2. Съкращения на латиница: 6

I. Увод 7

II. Цел и задачи 9

1. Цел 9
2. Задачи 9

III. Методи и материали 10

1. Участници в проучването 10

2. Клинична оценка на пациентите 13

3. Биологични проби 14

4. Методи за генетичен скрининг 14

4.1 Конвенционален цитогенетичен метод 15

4.1.1 Поставяне и обработка на клетъчни култури от цялостна кръв 15

4.1.2 Изготвяне на микроскопски препарати 16

4.1.3 Оцветяване на препаратите с GTG-техника 17

4.1.4 Микроскопски анализ 17

4.2 Микроделеционен анализ – MLPA 18

4.2.1 Определение: 18

4.2.2 Методология 18

4.3 Сравнителна геномна хибридизация (микрочипов анализ) – олигонуклеотидни микрочипове 19

4.3.1 Апаратура 19

4.3.2 Реактиви и консумативи 20

4.3.3 Техника 21

4.3.4 Подготовка на пробата 21

4.3.5 Белязане 21

4.3.6 Пречистване и комбиниране на белязаните проби 22

4.3.7 Хибридизация 23

4.3.8 Промиване 24

4.3.9 Сканиране на микрочиповете 24

4.3.10 Софтуерен анализ на данните 25

4.4 Новогенерационно секвениране – NGS ... 26
V. Резултати и обсъждане ... 27
1. Клинична оценка ... 27
2. Показатели на калциево-фосфорната обмяна ... 44
3. Генетичен скрининг ... 46
3.1 Конвенционално кариотипиране ... 46
3.2 MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации ... 53
3.3 Сравнителна геномна хибридизация (arrayCGH) ... 61
3.4 Таргетно секвениране по Sanger и NGS панели за краниосиностоза ... 65
VI. Изводи ... 75
VII. Приноси ... 75
1. Приноси с научен характер – оригинални: ... 77
2. Приноси с научен характер – потвърдителни: ... 78
3. Приноси с приложен характер: ... 78
4. Диагностичен алгоритъм при български деца с краниосиностоза ... 79
VIII. Научни публикации и участия по темата ... 80
IX. Благодарности ... 81
X. Summary ... 82

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 дефцит 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 dyplasia – 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 - Nijmengen 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 – robertsoninan (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. 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, като тя може да се дължи на екзогенни (позиционни, травматични) или на едногенни фактори (ендокринни, генетични). Поделя се на синдромна (когато черепната деформация е част от малформативен синдром) и несиндромна (изолирана), когато кранисиностозата е единствена проява. Несиндромната краниосиностоза съставлява около 80 % от всички случаи. 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. 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.

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. 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 микроструктурни 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.

III. 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).

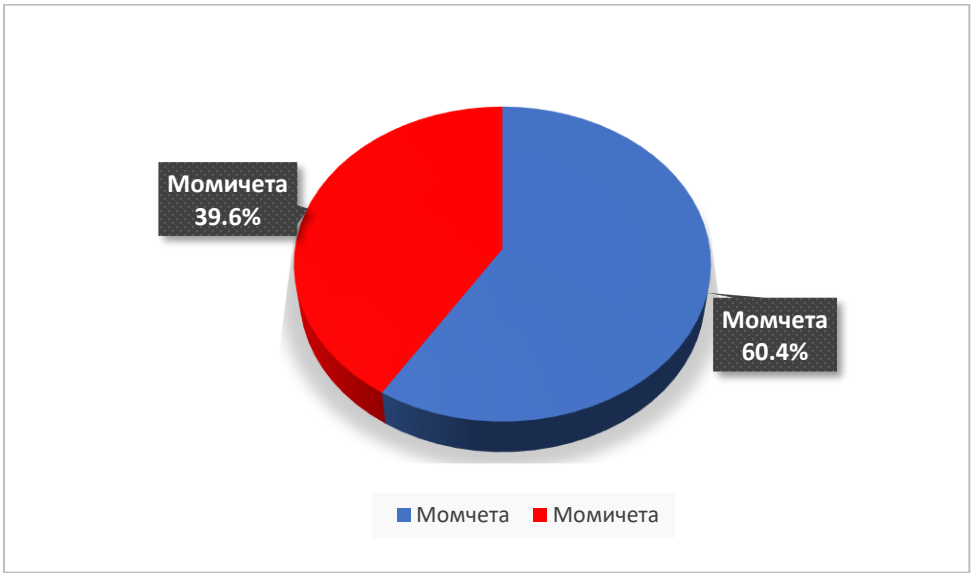
Критерий за включване:

- 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 показа: 60 момчета (60.4%) и 39 момичета (39.6%).



Фигура 1: Разпределение на изследваните деца по пол

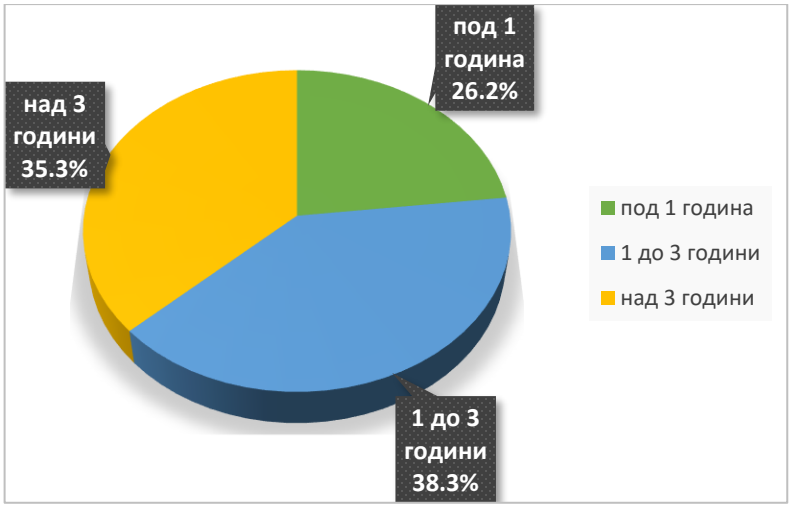
Възрастта е определена при първичната хоспитализация в Клинична генетика, когато е поставена диагнозата.

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 2: 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 случай 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 проведоха 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 +4ºC 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 -20ºC 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 проведоха в следната последователност:

4.1 Конвенционален цитогенетичн 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 проведе само при деца със съответните показания.

4.1 Конвенционален цитогенетичен метод

Конвенционалната цитогенетика като начална и задължителна стъпка от генетичния скрининг се проведе 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 ораБотка 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 разпръсване 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, абревиатура на оцветителната техника.
- Изсушените препрати 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 Na_2HPO_4, 0.1 g KH_2PO_4, 500 ml dH_2O), трипсин, буфер KH_2PO_4, буфер Na_2HPO_4.

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 KH_2PO_4, 41 ml буфер Na_2HPO_4, 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 сканираха 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).

4.3.1 Апаратура

- Лазерен скенер GenePix 4100A
- Хибридизационна 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 белязане на ДНК, съдържащ 5X буфер, 10X dNTP, Cy3 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), Cy5 dUTP (Deoxyuridine Triphosphate), exo-Klenow ензим, BlueGnome (UK, Cambridge)
- Хибридизационен кит, съдържащ 2xHi-RPM буфер и 10X блокиращ агент
- Олиго буфери 1 и 2 за промиване на хибридизиралите чипове (Agilent)
- Cot-1-ДНК
- ТЕ 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 хибридизация, даващи възможност за едновременен анализ на две проби върху един чип
- Покривни стъкла с гумени уплътнители (gasket slides) за хибридизиране на олиго микрочипове
- Колонки за пречистване и концентрация на ДНК, с целулозна мембрана, с обем на стартовия материал 500 µl, диаметър на порите 30 кDa (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) сканиране 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 H_2O 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 белязане (labeling mix)

Работи се с количества, необходими за 16 реакции (8 тест ДНК, белязани със Cy3 и 8 контролни ДНК, белязани със Cy5)

Смесване на ДНК-те със сместа за белязане

Във всяка епруветка, съдържаща ДНК и праймери се добавят по 19 μl от сместа за белязане, като тестваната ДНК се смесва със Cy3 и съответно контролната ДНК със Cy5 до краен обем 50 μl. Разбърква се чрез пипетиране и се центрофугира на пулс за събиране на компонентите на дъното на епруветката.

Белязане 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-2000c, 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 Cy3 се комбинира със Cy5, 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 5μm. 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 сканират автоматично. Сканираните образи се запаметяват 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 Cy3 и Cy5 се извършва спрямо целия набор от реплики върху чипа. Калкулира се съотношението Cy3/Cy5 (при тест - ДНК, белязана със Cy3) 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 хибридизиралите белязани клонове, а ординатата показва логаритмичното съотношение $\log_2$ между интензитетите на флуоресценция на Cy5 белязаните към Cy3 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 log2 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 log2 съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.

SBR

Референтни граници 5–20. Представлява 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 наблюдавахме изолирана (несиндромна) синостоза. Това разпределение е различно от установеното в литературата. 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 краниосиностза също могат да се причиняват от генетични дефекти, 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. Генетинчата 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. 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 3). 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 3 – Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 90 – изолирана метопична краниосиностоза (Архив на Клинична генетика)

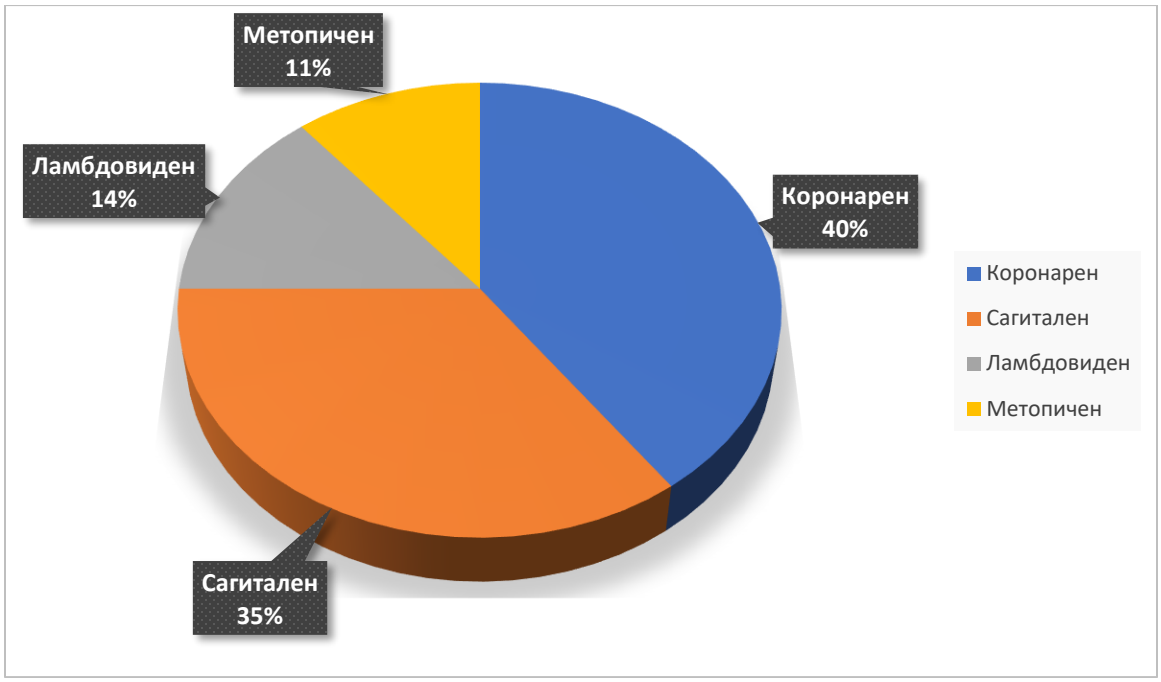
При 68 от децата (68.7%) се установи проста краниосиностоза (засягане на един от черепно-мозъчните шевове). При останалите 31 (31.3%) от децата се наблюдава комплексна синостоза (преждевременна осификация на два или повече от шевовете). Комплексните синостози се представиха като бисиностоза при 27 деца 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 краниофациален 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%. Единствената съществена разлика се състои в това, че ламбдовидната синостоза 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 недостатъчния 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 краниосиностоза. 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% .



Фигура 4: 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. 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 показа 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 показа 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 показа 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 микроделационен анализ, които показаха нормали резултати. Проведеният микрочипов анализ (aCGH) показа 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. Дефекти в *SYN3* се асоциират със значителен риск от развитие на шизофрения в зряла възраст. 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. 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 прилагахме в изследваната група деца.

При останалите 26 (26.2%) деца, синостозата се доказа 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 оказа 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. 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 психо-моторно 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 допринася за увреждането на мозъка и неговите обвивки. Хипотетичната етиопатогенетична връзка между тези

състояния остава неясна и изисква насочено изследване. Agochukwu 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 своевременна 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 краниосиностоза и следните допълнителни фактори: обструктивна сънна апнея, хидроцефалия, повишен вътречерпен 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 краниосиностоза. Agochukwu и сътрудници, изследват връзката между синдрома на Muenke (моногенна краниосиностоза) и епилепсия [Agochukwu *et al.* 2012]. От подбраните 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 краниосиностозата 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 краниосиностоза) 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 (статитискически 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. По-често срещаните са систематизирани в Таблица 1.

Пациент номер	Засегната система	Находка и симптоми
3	ГИТ, ОДА	Ингивнална херния, умбиликална херния, страбизъм, хипоспадия
6	ССС	Междупредсърден дефект с малък Л-Д шънт; отоврен FO
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, ССС	Полупрешлен Th6 и spina bifida на ниво Th5 – Th7; ЕхоКГ – персиситращи фет. Комуникации
91	-	Екзофталм, четирипръстна бразда на лява ръка
92	ОДА	Pectus excavatum, ставен хиперфлексибилитет
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 1 – 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 родителите (деца от социални заведения, адоптирани). При останалите 64 деца (64.6%) фамилната анамнеза показа:

- 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 – макроглосия, 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 показа 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 B (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.

- 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 бенигнена делеция на късото рамо на 2-ра хромозома - del 2p22.3 (50.89Kb) /2/ и бенигнена дупликация на дългото рамо на 17-та хромзома 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 µmol/l при норма за възрастта до 11-32 µmol/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. 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 глутамина. В резултат на тази терапия, нивата на амоняк при нашия пациент се редуцираха до 57/68 μmol/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 изследвния.

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 2.

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 2: Пациенти с доказана краниосиностоза и анамнеза за предхождащи аборти 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 показа 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. 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. 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 краниосиностоза. 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 краниосиностоза и кореспондиращ лицево-черепен дисморфизъм (Фигура 5); допълнителни скелетни аномалии (по-широки 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 железен 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 краниосиностоза. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации даде нормален резултат. Микрочиповият анализ (aCGH) показа: субмикроскопска дупликация на късото рамо на 1-ва хромозма - 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. 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.



Фигура 5: Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 35 (Архив на Клинична генетика)

При пациент 41 се установи сагитална краниосиностоза, нормално психо-моторно 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 показаха 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) краниосиностза, 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 хромзомни аберации при 9 от 45 изследвани деца с краниосиностоза. Това се равнявана приблизително 20% от случаите. През 2010 година, в група от 236 деца, претърпели неврохирургична интервенция поради краниосиностоза, Wilkie и сътрудници установяват честота на хромозомни аберации – 14%. 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. През 2011-та година, Passos-Bueno и екип от клинични генетици, провеждат друго мащабно проучване в литературата и установяват чесотота на хромозомните аберации при деца с краниосиностоза – 16%. Това доказва значението на хромозомния анализ при пациенти със синдромна краниосиностоза. В таблица 3 са обобщени находките от хромозмния 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,XУ, inv9(q13;p11)
36	46,XУ,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,XУ, + mar

Таблица 3: Находки от конвенционална цитогенетика при изследваната група деца с краниосиностоза.

Както е видно от Таблица 3 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 психо-моторно 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 показа 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 показа, че майката е носител на балансирана транслокация - 46,XX, t(15;21)(q23;q22.2). Не открихме асоциации между транлокация 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) показа: субмикроскопска дупликация на късото рамо на 1-ва хромозма - 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. 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 показа 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 – показа източника на този допълнителен материал, а именно микродупликация на късото рамо на 7-ма хромозма - 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 показа - 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 краниосиностоза и синдрома на Даун е известна, но рядко срещана и неуточнена. През 2014 година Siu и сътрудници описват две новородени

деца с тризомия 21 и едностранa (дясна) коронарна краниосиностоза. Клиничната им презентация е характерна за синдрома на Даун. Двете деца претърпяват неврохирургични интервенции поради повишен вътречерепен натиск - при първото дете е избран билатерален фронто-орбитален адвансмънт, а при второто – ендоскопски асистирана стрип-краниотомия с постоперативен коригиращ шлем. Оперативните резултати при двете деца са отлични.

- 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 бисиностоза 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 краниосиностоза, микроцефалия, наклонено чело, микроретрогнатия, ниско разположени ушни миди и комбиниран имунен дефицит. Кариограмата показа женски кариотип с множество несистемни хромозомни преустройства (виж Таблица 3). Микроделеционният анализ показа 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 показа наличие на несистемни хромозомни реогранизации, изразени в по-слаба степен. Асоциацията между NBS и краниосиностоза 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 краниосиностоза (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 близнак е по-силно изразена, което я прави обект на неврохирургична корекция. 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 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.
- 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 показа 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. 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 5). 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. 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. 6), генерализирано разстройство на развитието, митрална и аортна инсуфициенция, pectus excavatum, ставен хиперфлексибилитет, мускулна хипотония и тежко изоставащо нервно-психично развитие. Конвенционалното цитогенетично изследване показа 47,XY,+mar – небалансиран мъжки кариотип с маркерна хромозма с неидентифициран произход. MLPA за микроделеции, субтеломерни делеции и дупликации показа нормален резултат. Проведената aCGH установи: дупликация на дългото рамо на 15-та хромозома - dup 15q11.2q13.1 (6.26 Mb). Това доказа 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. 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 6 – 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 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. В таблица 7 са представени находките от микроделеционния скрининг, съпоставени с тези от конвенционалното кариотипиране.

Таблица 4 Съпоставка на находките от конвенционалната цитогенетика и тези от MLPA.

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

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 3).

- 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 показа нормален женски кариотип, но проведеният 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. 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. 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. 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 показа нормален мъжки кариотип, докато MLPA верифицира диагнозата с находка - del 7q11.23 (*ELN*) – синдром на Williams-Beuren. 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 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 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 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 7). 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 фронто-париетално 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 показа 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 5). 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. 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. 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 въвлечен в регулацията на лицевите и калвариалните структури, въпреки че точният механизъм остава неясен и изисква допълнителни изследвания.



Фигура 7 – 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 показа 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, показа субмикроскопска дупликацкя 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 5) Той кодира

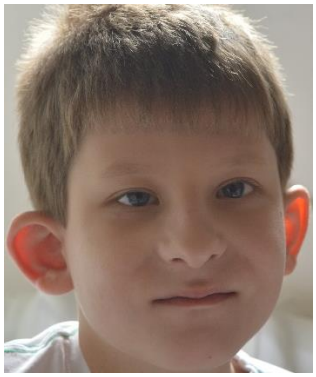
рецептор за трансформиращия растежен фактор тип III-бета (TGF-beta type III). Тези рецептори, заедно с групата на FGF рецепторите са широко експресирани в костните клетки и матрикс, и играят важна роля при преждевременната осификация на черепните шевове. Въз основа на това, предполагаме че дупликацията 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 . 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. 8), 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 показа 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. Характерният за синдрома лицев дисморфизъм се изразява в: антимонголоидни 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. 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). Zollino, Marangi и сътрудници изследват генотип-фенотипните корелации в група от 32 деца със синдром на Koolen-de Vries. 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 хаплоинсуфицения 17q21.31 и е претърпяло неврохирургична интервенция в кърмаческа възраст.

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 8 – 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

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	*FGFR4*
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	*SIX2*
82	46, XY	del 4q(*TRIML2*)	arr[hg19] 1p22.1 (92258725x2, 92326818-92705290x3, 92767467x2) (378.47 Kb)	вероятно патогенен	*TGFBR3*
94	46, XY	норма	del 1q43 (747Kb), dup 22q12.3 (715Kb)	вероятно патогенен	-

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. 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 5 – Обобщение на находките от aCGH, съпоставени с находите от конвенционалното кариотипиране и с тези от MLPA.

Таблица 6: 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)	*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.*
15	arr[hg19] 14q32.33(105524898x2, 105609511_105787438x0, 105845682x2) (177.93Kb)	*JAG2, MIR6765, NUDT14, BRF1, BTBD6* and *PACS2*
57	arr[hg19] 5q35.2 (175,470,501-177,136,261x0) (1.66 Mb)	40 HGNC and 24 OMIM genes, including *NSD1* and ***FGFR4***
63	arr[hg19] 1q12q21.2(120322008x2, 142513049_147134234x3, 147203277x2) (4.62 Mb)	*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*
68	arr[hg19] 2p22.3p16.1(36033514x2, 36095582_61287377x3, 61369298x2) (25.19 Mb)	*SLC8A1, THUMPD2, 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, DYNC2LI1, 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, 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, PRORSD1P, 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 синостоза на десния клон на коронарния шев, придружена от: краниофациален 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 5). В последствие, пациента беше скрининран за субмикроскопски хромозомни аберации чрез олиго-aCGH, което показа вероятно патогенна хомозиготна делеция на дългото рамо на 14-та хромозома - 14q32.33 (177.93Kb). В този регион се намират 6 гена (виж Таблица 6), които не са асоциирани с краниосиностоза до момента. В литературата, субмикроскопски делеции на 14q се свързват с две състояния: синдром на Dubowitz и 14q32.3 делеционен синдром. 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 краниосиностоза. 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 хромзома с размер 4.62 Mb, класифицирана като патогенен вариант (виж Таблица 5). Дуплицираният регион 1q12q21.2 съдържа 34 генни секвенции (виж Таблица 6), 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. Този случай е различен от

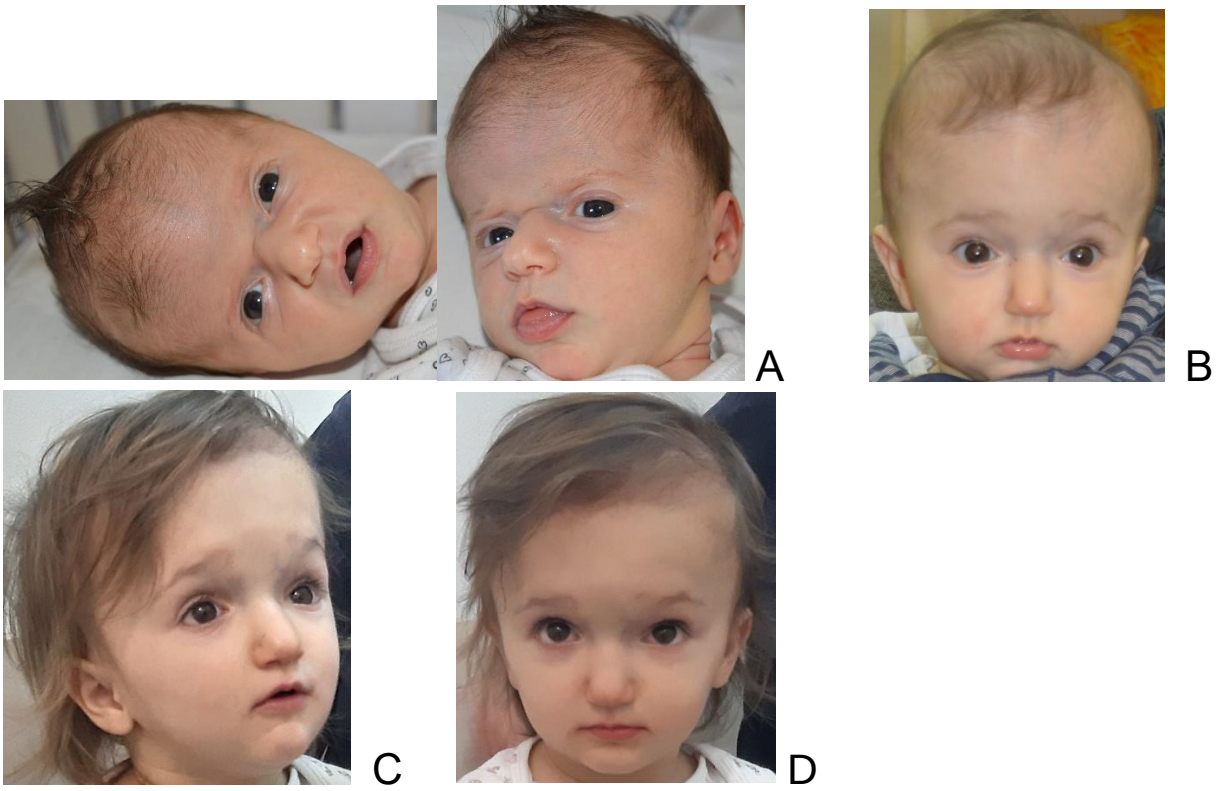
нашия пациент номер 63, поради допълнителната делеция на 16-та хромозома. Причината за възникване на краниосиностза при пациента остава неясна на този етап.

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.

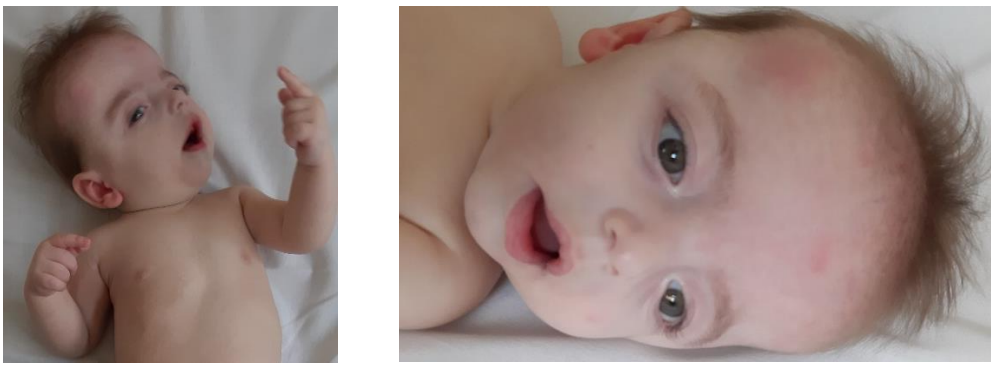
- При пациент номер 22 се установи комбинация от едностранна коронарна и сагитална краниосиностоза, водещи до предна плагицефалия. Наблюдаваха се още характерен лицев дисморфизъм, изоставащо психо-моторно развитие и парциална агенезия на corpus callosum (Фигура 9). Изследването на показателите на калциево-фосфорната 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 9). Въз основа на тези клинични находки се проведе NGS панел за краниосиностоза, който установи патогенен вариант c.749C>G (p.Pro250Arg) в *FGFR3* гена. Това верифицира диагнозата синдром на Muenke. 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 (по-често билатерална), макроцефалия, среднолицева ретракция, високо небце с палатосхиза, страбизъм, загуба на слух, психомоторно изоставане, епилепсия и други.



Фигура 9 – Краниофациален дисморфизъм при пациент номер 22 (синдром на Muenke): A – предоперативен дисморфизъм на 6 месечна възраст; B – резултати след краниопластика и адвансмънт на 9 месечна възраст; C 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 c.8459T>C, което постави диагнозата синдром на Cohen. 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. 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 (псевдоекзофталм, 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 10). Проведената краниография установи коронарна краниосиностоза, водеща до турицефална конфигурация на главата. Конвенционалното цитогенетично изследване показа 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 c.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). Характеризира се с: микроцефалия, агенезия на мазолестото тяло, абнормна анатомия на летералните 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. Тъй като детето живее в ДМСГД, нямаме възможност за снемане на фамилна анамнеза и за провеждане на сегрегационен анализ.



Фигура 10 – 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 11). 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 синостоза, без признаци на повишено вътречерепно налягане. Конвенционалното кариотипиране и микроделеционния анализ показаха нормални резултати. На базата на гореописания фенотип се проведе NGS панел за краниосиностози, който установи - вариант с неясно значение, c.352A>G (p.Ser118Gly) (вероятно мозаечен) в *EFNB1* гена. Тази находка верифицира диагнозата – Краниофронтоназална дисплазия CFND. Рядко, Х-свързано състояние, което се характеризира с: краниосиностоза (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. 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 11 – 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 12). Конвенционалното цитогенетично изследване показа нормален резултат – 46,ХУ. На базата на характерната клинична картина, проведохме таргетно секвениране на *TWIST1* гена, което установи наличието на патогенен вариант: c.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 хромзома. 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.

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. Терапевтичният подход често е неврохирургичен.



Фигура 12 – 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 13). 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 c.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. I-ви тип се причинява от дефекти в гените *FGFR1* и *FGFR2*. Тип II и III се причиняват от патогенни варианти в *FGFR2*. 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 случай конфигурацията на черепа се определя като „детелиновидна“). 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).



Фигура 13 – Дисморфични стигми при пациент номер 99 – синдром на Pfeiffer тип 1 (Архив на Клинична генетика).

3.5 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 проведоха:

- 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 B12 и Хомоцистеин при 1 дете (1.01%)
- Количествено изследване за мукополизахариди в урина (ГаГ в уринатa) – при 11 деца (11.11%)

Таблица 7 – Обобщение на метаболитните находки при изследваните деца с краниосиностоза

Пациент номер	***Краниосиностоза***	***Находка***
12	частична сагитална и коронарна	TMS, B12 - констелация за дефицит на Кобаламин G. Таргетно секвениране на *MTR* – гена – два патологични варианта – c.3518C>T (P1173L) / c.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 7, 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 7), 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 B12, 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 – c.3518 C>T (P1173L) / c.3613 G>T (E1204X) – смесен хетерозигот. Sloan, Carillo и сътрудници публикуват литературна справка посветена на интрацелуларните нарушения на кобаламиновия метаболизъм. 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 – макроглосия, 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 B; син на сестрата на майката (първи братовчед) с болест на Sanfilippo B. Конвенционалното цитогенетично изследване показа 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 показа 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.

- 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 (Фигура 14). 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 бенигнена делеция на късото рамо на 2-ра хромозома - del 2p22.3 (50.89Kb) /2/ и бенигнена дупликация на дългото рамо на 17-та хромзома 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 µmol/l при норма за възрастта до 11-32 µmol/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 μmol/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 14 – Дисморфични стигми при пациент номер 32 – неуточнена хиперамониемия, краниосиностоза и косангвинитет 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 българки 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 н 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 възникнване на синдромна краниосинстоза 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 краниосинстоза.
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:

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

2. Приноси с научен характер – потвърдителни:

- Потвърди се асоциация между краниосиностоза и някои синдроми (Down, Cohen, Williams, Sotos)
- Потвърди се ролята на моногенните дефекти при пациенти със синдромна краниосиностоза
- Потвърди се ролята и честотата на хромозомните аберации при пациенти със синдромна краниосиностоза.
- Потвърди се ролята и честота на субмикроскопските небалансирани аберации при пациенти със синдромна краниоситностоза.

3. Приноси с приложен характер:

- Изработен е диагностичен алгоритъм, адаптиран за нуждите на български деца с краниосиностоза (виж по-долу).
- Всички деца с потвърдена краниосиностза се консултираха с неврохирург. 13 от тях претърпяха оперативни намеси с добри резултати.
- Поставена е етиологична диагноза при 17 деца с краниосиностоза. Предоставена е генетична консултация на техните семействата.
- Създадена е ДНК банка от пациенти с краниосиностоза и част от техните родители, която е необходима база за бъдещи изследвания от нова генерация

4. Диагностичен алгоритъм при български деца с краниосиностоза



VIII. Научни публикации и участия по темата

- **Делчев, Т., Д. Авджиева-Тзавелла, А. Кадъм, Р. Георгиева** Синдром на Muenke - клиничен случай - Списание Педиатрия Том 2 2020

- **Делчев, Т., Авджиева-Тзавелла Д.** Синдромни краниосиностози. Профилактика, диагностика и терапия в детско-юношеската възраст (сборник) 2017, 181-191

- **Делчев Т., Авджиева-Тзавелла Д**., **Хаджидекова С., Кадъм А., Станева Р., Тончева Д.** Микрочипов скрининг при пациенти със синдромна краниостеноза. Профилактика, диагностика и терапия в детско-юношеска възраст. Арбилис 2020 г., под редакцията на проф. И. Литвинеко и проф. Н. Ламбов, стр. 113-116

- **T. Delchev, S. Hadjidekova, S. Bichev, Ts. Veleva, I. Boneva, D. Avdjieva-Tzavella**, Comprehensive genetic evaluation of Bulgarian children with syndromic craniosynostosis. Balkan Journal of Medical Genetics, 15th issue, March 2023

- **Т. Делчев**, Резултати от генетичен скрининг при пациенти с краниосиностоза, Първа педиатрична среща „С грижа за децата“, Несебър 2021

- **T. Delchev, Ts. Veleva, M. Sredkova, D. Avdjieva-Tzavella,** A case of structural brain anomalies with impaired intellectual development and craniosynostosis caused by a novel *ZIC1* gene variant**,** ESHG – Hybrid Conference, Vienna, Austria June 11-14, 2022

- **T. Delchev, D. Avdjieva-Tzavella, H. Kathom, S. Hadjidekova, R. Staneva, D. Toncheva,** Detection of genetic imbalances by array-based comparative genomic

hybridization in patients with syndromic craniostenosis, ESHG – Conference, Berlin, Germany, June 2019

IX. Благодарности

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 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!

X. Summary

Clinical and genetic characteristics of children with craniosynostosis

Craniosynostosis is the process of premature fusion and ossification of one or more cranial sutures. It has a cumulative incidence of about 1 in 2500 newborn children. When untreated, craniosynostosis can lead to serious medical complications – increased intracranial pressure, mental retardation, hearing or vision defects, behavioural anomalies, craniofacial asymmetry and dysmorphism, seizures.

Craniosynostosis can be classified as *syndromic* – when the cranial defect is a part of a malformative syndrome or *nonsyndromic* – when it presents as an isolated feature. Nonsyndromic craniosynostosis constitutes about 80% of all known cases. The syndromic craniosynostosis is considerably rarer – 20 % of all repoted cases. About 30% of the syndromic forms of craniosynostosis are mainly attributed to pathogenic variants in certain genes (*FGFR1, FGFR2, FGFR3, TWIST1, EFNB1, MSX2, RAB23, RUNX2*). They are inherited in an autosomal dominant pattern (except for *RAB23*) with variable penetrance and expressivity. Chromosomal anomalies account for about 14-16% of all craniosynostosis cases. MLPA and arrayCGH offer similar diagnostic value in literature and should be used in tandem to confirm a certain finding.

Despite the scientific achievements in the last two decades, the genetic basis of craniosynostosis remains rather poorly understood. Trying to clarify the complex genetic factors involved in the pathogenesis of syndromic craniosynostosis we investigated 99

Bulgarian children by carrying out a systematic, combined approach consisting of conventional cytogenetics, MLPA and aCGH.

Pathological findings were established in 17.9% (17/99) of the cases using aCGH, in 10.3% (10/99) using MLPA and 12.37% (12/99) using conventional karyotyping. About 5.3% of the patients with normal karyotype carried submicroscopic chromosomal rearrangements. Duplications were found to be more common than deletions.

The systematic genetic evaluation of children with SC revealed a high prevalence of submicroscopic chromosomal rearrangements (most commonly duplications). This suggests the leading role of those defects in the pathogenesis of syndromic craniosynostosis. The genetic complexity of SC was reaffirmed by the discovery of pathological findings in various chromosomal regions. Certain genes were discussed in conjunction with craniosynostosis.