МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ - СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

МАРТА МИХАЙЛОВА

Вариации в броя копия при деца с нарушения в развитието

Д И С Е Р Т А Ц И Я

за присъждане на образователна и научна степен

“ДОКТОР”

Област на висше образование: 4.„Природни науки, математика и информатика”

Шифър 4.3.

Професионално направление: „Биологични науки”

Научна специалност: „Генетика”

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ: ЧЛ. КОР., ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ДБН

ДОЦ. Д-Р САВИНА ХАДЖИДЕКОВА, ДМ

1 Съдържание

2 Въведение xi

3 Литературен обзор xiii

3.1 Определение и същност на вродените аномалии. xiii

3.2 Честота на вродените аномалии xiv

3.3 Периоди на възникване на вродените аномалии xvi

3.3.1 Преембрионален период xvii

3.3.2 Ембрионален период xviii

3.3.3 Фетален период xviii

3.4 Класификация на вродените аномалии xix

3.4.1 Класификации по МКБ10 xx

3.4.2 Класификация на аномалиите според времето на възникване xx

3.4.3 Класификация на вродените аномалии според клиничното им значение xxii

3.4.4 Класификация на вродените аномалии по брой засегнати системи или части на тялото. xxii

3.4.5 Класификация по етиология на вродените аномалии xxiv

3.5 Етиология на вродените дефекти на развитието. xxv

3.5.1 Генетична етиология на вродените аномалии xxv

3.5.2 Етиологични фактори на средата водещи до поява на вродени аномалии. xliv

3.5.3 Мултифакторна етиология на вродените аномалии lii

3.5.4 Идиопатични аномалии liii

3.6 Диагностични подходи при вродените аномалии lv

3.6.1 Цитогенетичен анализ lvi

3.6.2 Молекуларно-генетични методи lvii

3.6.3 Молекулярно-цитогенетични методи lx

3.7 Превенция на нарушенията в развитието lxviii

3.7.1 Детекция lxix

3.7.2 Лечение и грижи lxx

3.8 Обобщение lxxi

4 Цели и задачи lxxii

4.1 Цели lxxii

4.2 Задачи lxxii

5 Материали и методи lxxiii
5.1 Участници в проучването lxxiii
5.2 Биологични проби lxxiii
5.2.1 Използвани методи lxxiii
Електрофоретична оценка на качеството на изолираната ДНК lxxv
6 Резултати lxxxiv
6.1 Патологични вариации в броя копия lxxxv
6.1.1 Пациент 79 lxxxvi
6.1.2 Пациент 52 lxxxvii
6.1.3 Пациент 46 lxxxix
6.1.4 Пациент 41 xc
6.1.5 Пациент 35 xci
6.1.6 Пациент 30 xciii
6.1.7 Пациент 24 xciv
6.2 Нормални вариации в броя копия и вариации в броя копия с неясно клинично значение xcv
7 Обсъждане xcvii
7.1 Обсъждане на установените патологични CNVs в търсене на генотип-фенотипни корелации. xcvii
7.1.1 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 44 - arr 7q31.2(115,099,099-116,966,889)x3 xcviii
7.1.2 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 50 – arr 8p23.2 (2,625,441-4,173,665)x3, 9q33.1 (120,022,793-121,547,117)x3 xcix
7.1.3 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 2 – arr 16p11.2 (28,861,561-29,031,030)x3, 21q22.3 (48,067,895-48,090,288)x3 xcix
7.1.4 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 53 – arr 3q26.32 (177,889,843-179,472,535)x2 c
7.1.5 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 79 - arr 2p16.3(50,982,143-51,314,401)x1; 5q35.2q35.3(175,470,501-177,136,261)x1 c
7.1.6 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 52 - arr 10q26.12q26.3(122,804,780-135,434,149)x1 cii
7.1.7 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 46 - arr 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1; 12p13.33p13.1(230,451-14,111,977)x3 civ
7.1.8 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 41 - arr 17q12(34,450,435-36,248,889)x1 cvii

7.1.9 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 35 - arr 22q11.21q11.22(21,561,492-22,905,039)x1 cix

7.1.10 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 30 - arr 15q11.2q13.1(22,765,658-29,030,488)x3 cx

7.1.11 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 24 - arr 15q11.2(22,765,658-23,260,485)x1 cxii

7.2 Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение cxiii

7.2.1 Нормални вариации в броя копия cxiv

7.2.2 Вариации в броя копия с неясно клинично значение cxvii

7.3 Обсъждане на вероятно нормалните вариации в броя копия cxix

7.3.1 Вариации с неясно клинично значение cxix

7.3.2 Патологични вариации cxxii

7.4 Обобщение на честотите на вариациите в броя копия след интерпретацията на резултатите. cxxii

8 Заключение cxxiv

9 Изводи cxxiv

10 Приноси cxxviii

10.1 Приноси с научен характер cxxviii

10.2 Приноси с приложен характер cxxviii

11 Използвана литература: cxxix

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ cxlvi

Благодарности

Благодаря сърдечно:

- на научните си ръководители: Чл. кор. професор д-р Драга Тончева и Доц. Хаджидекова за помощта при изработването, написването и оформянето на настоящата дисертация, за възможността да работя в този чудесен колектив.

- на колегите ми от Катедрата по Медицинска генетика за подкрепата и разбирането, които проявиха.

- на д-р Рада Станева за ценните съвети и професионална помощ, с което подпомогна значително изработването на настоящият труд.

- на д-р Даниела Авджиева-Тзавелла за помощта при набирането на пациентите,

- на всички пациенти и техните родители за съдействието при реализирането на този научен труд,

- на семейството ми – за безрезервната подкрепа и обич.

Използвани в текста съкращения

Съкращения на кирилица

БХС - биохимичен скрининг

ВА - вродени аномалии

ГДП - горни дихателни пътища

г.с. - гестационна седмица

ДНК - дезокси - рибонуклеинова киселина

ДНТ - дефекти на невралната тръба

ДС - дихателна система

ДЧ - дихателна честота

ЕЕГ - електроенцефалограма

ЕМГ - електромиография

ЕхоКГ - ехокардиография

ИН - интелектуална недостатъчност

КГДП - катар на горни дихателни пътища

КТ - компютърна томография

МКБ - Международна Класификация на Болестите

мтДНК - митохондриална ДНК

НПР - невропсихично развитие

НС - нервна система

ОДС - опорно-двигателна система

ПАК - персистиращ артериален канал

ПМТ - подкожна мастна тъкан

ПД - пренатална диагностика

СГХ - сравнителна геномна хибридизация

СЗО - Световна Здравна Организация

СП - сондром на Поланд

ССС - сърдечно-съдова система

ТФЕ - трансфонтанелна ехография

УЗ - ултразвук

ФАС - фетален алкохолен синдром

ХА - хромозомна аберация

ЦГА - цялостен геномен анализ

ЦНС - централна нервна система

Съкращения на латиница:

array CGH - array-based Comparative Genomic Hybridization (микрочипова сравнителна геномна хибридизация)

BAC - Bacterial Artificial Chromosome (изкуствена бактериална хромозома)

bp - Base Pairs (базова двойка)

CCD - Charge-Coupled Device (прибор със зарядна връзка)

CGH - Comparative Gemomic Hybridization (сравнителна геномна хибридизация)

CHARGE - Coloboma, Heart Defects, Choanal Atresia, Retarded Growth and Development, Genital Abnormalities, Ear Anomalies (колобома, сърдечни дефекти, атрезия на хоаните, изоставане в развитие, генитални аномалии, аномалии на ухото)

CNVs - Copy Number Variations (вариации в броя копия)

Cy3 - Cyanine 3 (цианин 3)

Cy5 - Cyanine 5 (цианин 5)

DGV - Database of Genomic Variants (база данни на геномните варианти)

EDTA - Ethylene Diamine Tetraacetic A (етилен диамино-тетраоцетна киселина)

FAS - Fetal alcohol syndrome (фетален алкохолен синдром)

FISH - Fluorescent in Situ Hybridization (флуоресцентна ин ситу хибридизация)

FoSTeS - Fork Stalling And Template Switching (инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата)

GTG - G-banding by Trypsin and Giemsa (G лентуване чрез трипсин и боя на Гимза)

Kb - Kilobase (килобаза)

LCRs - Low Copy-number Repeats (ниско-повторени копия)

LSD - Lysergic acid diethylamide

Mb - Megabase (мегабаза)

MDA - Multiple Displacement Amplification (множествена амплификация чрез отместване на пробата)

mFISH - Multiplex FISH (мултиплексна флуоресцентна ин ситу хибридизация)

MLPA - Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (множествена лигазно медиирана амплификация на пробата)

MMBIR - microhomology-mediated break-induced replication

MURCS - Mullerian Duct Aplasia, Renal Aplasia, Cervicothoracic Somite Dysplasia (аплазия на Мюлерови канали, бъбречна аплазия, дисплазия на цервико-торакалния сегмент)

NAHR - Nonallelic Homologous Recombination (не-алелна хомоложна рекомбинация)

NGS - Next Generation Sequensing (секвениране от следващо поколение)

NHEJ - Non-Homologous End-Joining (не-хомоложно лигиране на терминални участъци)

PAC - P1-plasmid Artificial Chromosome (P1 - плазмидна изкуствена хромозома)

PCR - Polymerase Chain Reaction (полимеразна верижна реакция)

PRINS - Primed In Situ Hybridization

QC - Quality Control (качествен контрол)

QF-PCR - Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция)

SBR - Signal to Background Ratio (съотношение на интензитета на сигнала към фоновия шум)

SD - Standard Deviation (стандартно отклонение)

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (натриев додецил сулфат)

SG - Spectrum Green (зелен спектър)

SKY - Spectral Karyotyping (спектрално кариотипиране)

SNPs - Single Nucleotide Polymorphisms (единичен нуклеотиден полиморфизъм)

SO - Spectrum Orange (оранжев спекър)

SSC - Saline-Sodium Citrate (солеви натриев цитрат)

SSR - Simple sequence repeat

STRs - Short Tandem Repeats (къси тандемни повтори)

UPD - Uniparental Disomy (монородителска дизомия)

VACTERL - Vertebral, Anal Atresia, Cardiac Defects, Tracheoesophageal Fistula, Renal Anomalies, Limb Anomalies (гръбначни аномалии, атрезия на ануса, сърдечни дефекти, трахеоезофагеална фистула, бъбречни аномалии, аномалии на крайниците)

VNTR - variable number tandem repeat

YAC - Yeast artificial chromosome

2 Въведение

Нарушенията в развитието, които по същество представляват вродени аномалии (ВА) са една от най-честите причини за детска смъртност в развитите страни. Честотата им е от 3-5% от всички раждания и са водещата причина за фетална, неонатална, детска смъртност и заболеваемост[1]. Всяка година в България се раждат около 3500 нови болни, като близо 20% от детската смъртност се дължат на вродени аномалии. Поради високата хетерогенност на генетичните аберации и разнообразната по вид и време на поява клиничната картина, причините за голям процент от новопоявилите се случаи (40-60%) остава неясна. През 60-те години на миналия век цитогенетичният анализ е залегнал като златен стандарт прилаган рутинно в България за диагностика на ВА. Въпреки това методът е времеемък, трудоемък, с ниски резолютивни възможности, сравнен с по-модерни методи, изисква специализирани умения и е труден за автоматизиране. Това често го прави недостатъчен за поставяне на точна диагноза, което е изключително важно за провеждането на правилно и своевременно лечение както и за нуждите на пренаталната и предимплантационната диагностика. Благодарение на прилагането в последните десетилетия на молекулярни и молекулярно–цитогенетични технологии като FISH (Fluorescent in Situ Hybridization), QF-PCR (Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction), MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)[2,3] заедно с цитогенетичните методи, се диагностицираха широк спектър от заболявания. Методите са с по-висока резолюция, но изискват предварителна информация за подозираната хромозомна аномалия и нейната локализация. Също така, не позволяват цялостен анализ. Следващите и по-нови технологии като микрочиповата сравнителна геномна хибридизация (array Comparative Genomic Hybridization – aCGH) и II-ро поколение секвениране (Next-Generation Sequencing – NGS), позволяват скрининг на целия геном за вариации в броя копия (Copy Number Variations – CNVs) и съответно - секвениране. Методите са високо резолютивни и позволяват детекция на по-голям брой хромозомни аномалии, което подобрява и персонализирания подход към пациентите. Принципът на използваната в настоящия изследователски труд СГХ - сравнителна геномна хибридизация, (array CGH - array-based Comparative Genomic Hybridization), се основава на конкурентна хибридизация на различно белязани контролна и тест ДНК върху фиксирани на твърд носител ДНК фрагменти, като резолюцията зависи от размера и гъстотата на фиксираните клонове. Технологията позволява цялостен геномен скрининг с висока резолюция на небалансирани геномни микроизменения, недиагностицирани с други

методи. Това прави техниката ефективна при анализирането на заболявания зависими от генната доза. Прецизното локализиране на аберацията и разкриването на точния размер е важно за идентифицирането на гените засегнати от преустройството, което ще позволи разкриването на нови генотип-фенотипни корелации. При установени вече с цитогенетичен метод балансирани преустройства, микрочиповата СГХ би могла да потвърди резултата или да установи по-малки преустройства, превръщащи балансирания характер на аберацията в небалансиран, променяйки цялостните изводи. В допълнение, микрочиповата СГХ има потенциал да подобри нашите знания и за нормалните количествени варианти в човешкия геном.

По темата са работили много изследователи[4-14]. Първото проучване в България върху пациенти с вродени аномалии посредством микрочипов ДНК анализ на вариации в броя копия (CNVs - Copy Number Variations) на целия геном е направено от доц. Хаджидекова и е описан в дисертационния й труд[15]. Спектърът от специфични генетични нарушения свързани с определен фенотип е силно хетерогенен и все още слабо се познава. Именно поради това настоящия изследователски труд е насочен към разкриването, описването и класифицирането на вродените аномалии при голям брой изследвани пациенти посредством същата технология, с цел разширяване на познанията в областта, откриване на нови генотип-фенотипни корелации, обогатяване на литературните данни и подпомагане персоналния диагностичен и терапевтичен подход към пациентите. Това ще окаже влияние върху качеството на живота, семейния климат и би могло да повлияе положително върху раждаемостта и икономическите показатели на България.

3 Литературен обзор

3.1 Определение и същност на вродените аномалии.

Думата "вродена" означава "при раждането,"а"аномалия" идва от гръцката дума "anomalos", което означава "неравномерно" или "неправилно". Съгласно определението за вродени аномалии(ВА) на Световната Здравна Организация (СЗО - 2016г), те представляват структурни или функционални аномалии (например, метаболитни нарушения), които възникват по време на вътреутробното развитие и могат да бъдат идентифицирани пренатално, постнатално, или по-късно в детска възраст. Известни са още като вродени дефекти, вродени заболявания или вродени нарушения. Вродените структурни аномалии са видими при раждането макроскопски морфологични аномалии [СЗО, 2016]. Представляват първичен дефект на определена част от тялото, който води до промяна на структурата или конфигурацията на съседни или ембриологично свързани с нея други нейни части[16]. Към структурните аномалии спадат малформациите, деформациите, дисрупциите и хистологичните дефекти (аплазия, хипоплазия, хиперплазия, дисплазия). Голяма част от множествените малформации се съчетават и с умствена недостатъчност, като доскоро употребяваният термин „умствена недостатъчност" е заменен с „интелектуална недостатъчност"[17] Вродените аномалии могат да бъдат класифицирани по много признаци, като най-общо според периода на възникване и обекта на действие биват гаметопатии, бластопатии, ембриопатии и фетопатии. Според представянето си в организма са изолирани и системни. Според последователността на възникване се делят на първични и вторични, а в завизимост от етиологията си биват най-общо наследствени, екзогенни, мултифакторни и идиопатични.

Поради съществената роля на вродени аномалии като причина за детска смъртност, хронични заболявания и увреждания в света, на 63 – та световна здравна асамблея (2010), държавите-членки се споразумяха за насърчаване първичната превенция и подобряване на здравето на децата с вродени аномалии, като се подпомогнат следните области:

- развитие и укрепването на системите за регистрация и надзор.
- изграждане на опит и капацитет.
- засилване на научноизследователската дейност и проучвания на етиология, диагностика и профилактика.
- насърчаване на международното сътрудничество.

На фигура 1 са изобразени причините за детска смъртност на световно ниво.

Ключови факти за вродените аномалии според СЗО (2016г.)са:

✓ Около 303 000 новородени в световен мащаб умират в рамките на 4 седмици след раждането всяка година, поради вродени аномалии.

✓ Вродените аномалии могат да допринесат за дългосрочно увреждане, което може да окаже значително въздействие върху индивидите, семействата, здравните системи и общества.

✓ Най-често срещаните, тежки вродени аномалии са сърдечни дефекти, дефекти на невралната тръба и синдром на Даун.

✓ Въпреки, че вродените аномалии могат да са резултат от един или повече генетични, инфекциозни, хранителни и екологични фактори, често е трудно да се определят точните причини.

✓ Появата на някои вродени аномалии може да бъде предотвратена. Ваксинирането, адекватният прием на фолиева киселина или йод оптимизиране на храненето, приемът на подходящи хранителни добавки и адекватна пренатална грижа са само някои примери за превенция.

Фигура 1. Адаптирано от СЗО (2016 година).

3.2 Честота на вродените аномалии

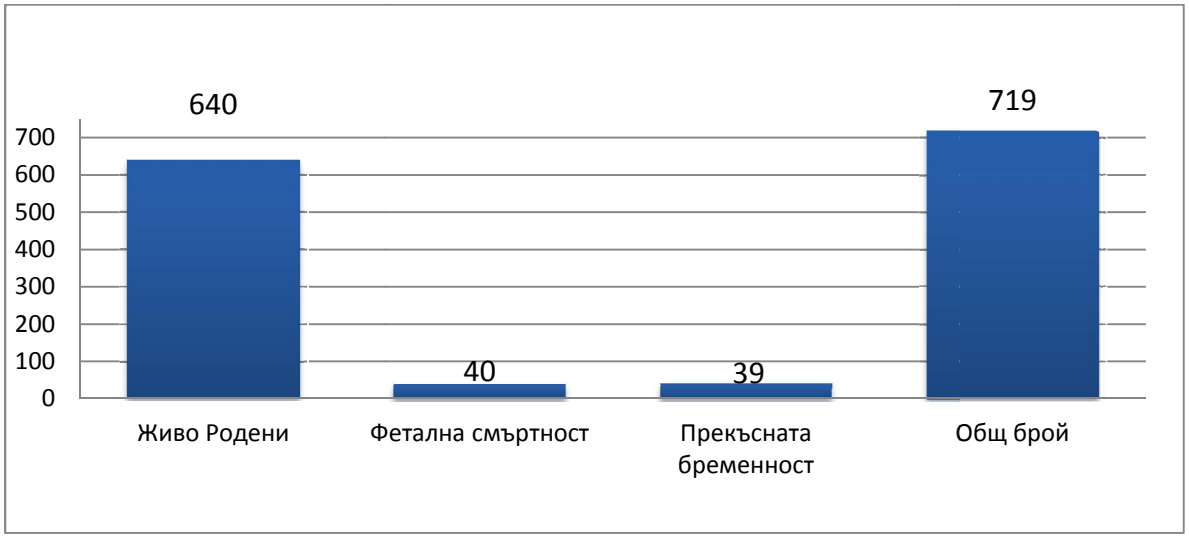
Според обобщени данни ежегодно се раждат около 8 милиона деца с вродени аномалии и заболявания, като до 60-70% от тях са генетично обусловени. Според доц.

Катя Ковачева, данните за България показват, че при средно 70 000 раждания годишно, при близо 3000 от новородени деца се установяват вродени малформации или генетични дефекти. Според данни от регистъра за вродени аномалии, ряхната честота за България (около 3%) не се отличава от средната за Европа. 60-70% от вродените дефекти и генетични заболявания са налице още при раждането, с честота около 3%, а известна част от вродените дефекти се проявяват през по-късните етапи от развитието на детето, като действителната честота на вродените аномалии допълнително се повишава до 4-6%. Според данни на EUROCAT е установено покачване на вродените дефекти в резултат на неблагоприятни въздействия на средата по време на бременността, което показва колко е важно подобряването на майчиното здраве преди и по време на бременността. В последните години е установено както за Европа така и за България покачване на честотата на синдром на Даун в корелация с напредване на възрастта на бременните жени. Поради добрите диагностични практики, много от тези случаи се установяват в период позволяващ взимане на информирано решение относно евентуално прекъсване на бременността. Честотата на вродените аномалии е различна в зависимост от най-общите причини за възникването им, а те са: генетични, негенетични и комплексни (мултифакторни). Така в България около 40-50% от общият брой вродени дефекти са в резултат на комплексни генетични (най-често фамилно унаследени) и негенетични фактори (инфекции, лекарства, алкохол, тютюнопушене и др.). Сред тях на челно място са вродените сърдечните малформации с честота 4-6 на 1000, следвани от аномалиите на централната нервна система (ЦНС) - 2-3 на 1000, като от тях най-значими са дефектите на неврална тръба (ДНТ) с честота 1-2 на 1000. С подобна честота са и цепките на устната и небцето.

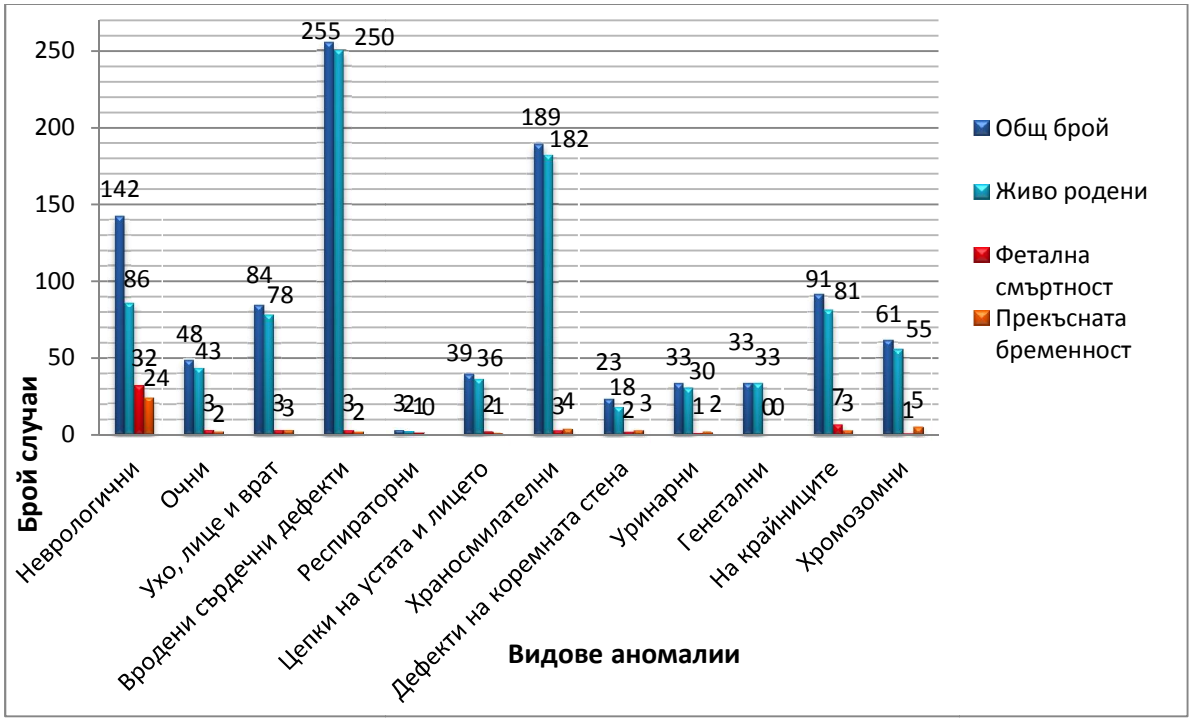
Хромозомните и генно обусловени аномалии са от порядъка на 20-25% от всички аномалии. Поради тежестта на клиничната картина и високия процент спонтанни аборти общата им честота е по-ниска, като на хромозомните аномалии при живо родени деца се падат 2 до 4 на 1000, а за моногенните дефекти съответно – 4 до 5 на 1000. Сред хромозомно обусловените дефекти най-чест е синдромът на Даун, с честота около 1 на 900 раждания като в 95% от случаите е ненаследствено състояние зависещо в немалка степен от възрастта на майката, поради което подлежи на масов пренатален скрининг.

Негенетичните фактори (механични въздействия, съдови причини и др.), предсталяват около 10% от всички аномалии, а около 40% от вродените дефекти остават с неясна етиология, според доц. д-р Катя Ковачева и нейната монография

(„Вродени аномалии. Клинико-дисморфологични и генетични проблеми“). На фигури 2 и 3 са отразени общия брой аномалии по подавани данни до момента за София-град и съответно честотата по органи и системи по данни на EUROCAT.



Фигура 2. Общ брой аномалии при популация 38 257 души от 1996г. до 1999г.



Фигура 3. Честота на аномалиите по органи и системи.

3.3 Периоди на възникване на вродените аномалии

Пренаталното развитие на човека протича в рамките а 280 дни или 10 лунарни месеца, като преминава през три основни етапа, по време на които могат да възникнат различни по брой и вид аномалии. Важно е да се отбележи, че някои структурни аномалии като например персистиращия артериален канал (ПАК) се появяват след раждането. Познаването на спецификата на периодите на развитие и особеностите на аномалиите по отношение на времето им на поява или проява, са важни за своевременното диагностициране и последваща терапия. Най-общо периодите на възникване на вродените аномалии се делят на преембрионален, протичащ в няколко фази, ембрионален и фетален.

3.3.1 Преембрионален период

Бележи началото на развитието – от оплождането до втората седмица на бременността. Периодът протича в 2 фази:

- **Сегментация –** това е етапът на делене на зиготата, чрез последователни митотчни деления, в резултат на които се образуват бластомери или така наречената стереобластула с обособени централно и периферно разположени бластомери. От централно разположените се образува ембриобластът, даващ по-нататъшното развитие на зародиша, а от периферно разположените – трофобластът, от който се развива плацентата.
- **Гаструлация –** този етап протича след имплантиране на оплоденото яйце и оформяне на стереобластула, като еднослойното мехурче се превръща в двуслойно наречено гаструла. В нея се различава двуслойна стена, образувана от вътрешен ендодермален лист и външен ектодермален. По-късно между двата се обособява трети лист наречен мезодерма. Така през този стадий се оформят трите зародшеви листа, от които се образуват различните тъкани. Наличието на бързоделящи се недиференцирани клетки крие риск от възникване на аномалии. Етапът протича до 14-ят ден от оплождането на яйцеклетката.

През този етап развиващите се вродени аномалии могат да бъдат разделени на:

- **Гаметопатии –** възникват при участие в оплождането на дефектни гамети, като формираната зигота често загива или се развива аномален фетус. Дефектите в половите клетки могат да бъдат резултат от генетични фактори, екзогенни фактори или произтичащи от майчиния организъм (увеличен интервал между узряването и оплождането на яйцеклетката поради непроходимост на тръбите), имунни процеси и др.

- **Бластопатии –** възникват през първите 2 седмици от оплождането. Включват нарушение в имплантацията на оплодената яйцеклетка, нарушения в развитието на пъпната връв, амниона и плацентата, единични аномалии и др. Въздействието на неблагоприятни фактори през този период води до реакция от типа «всичко или нищо», зародишът или оцелява без аномалии или загива.

3.3.2 Ембрионален период - протича от трета до осма седмица (10-та гестационна седмица) от пренаталното развитие. През този етап продължава усиленото клетъчно делене и се извършва диференциация на тъканите и органогенеза от трите зародишеви листа. Протичат множество количествени и качествени изменения, които са в строго определен ред, необратими са, наследствено програмирани и силно зависими от условията на средата, в която протичат. Именно затова през този етап бременността е силно уязвима и мнозинството от ВА възникват тогава. Възникващите през този етап аномалии се наричат:

- **Ембриопатии –** това са най-честите вродени аномалии на плода. Примери са Рубеолната ембриопатия – триада на Грег, включваща катаракта, глухота и вродени сърдечни малформации; фокомелия причинена от прием на талидомит и др. Нови проучвания показват, че терапията на хиперфункция на щитовидна жлеза с метимазол води до ембриопатия включваща най-често омфалоцеле, атрезия на хоаните и на хранопровода и аплазия на кожата[18]. Според друго проучване на изследователи от Диабетния център Джослин е идентифициран ключов ензим, водещ до диабетна ембриопатия, изразяваща се в дефекти на невралната тръба, спина бифида и някои вродени сърдечни пороци[19.] Смята се, че майчината хипергликемия може да причини оксидативен стрес и да потисне изявата на гена *PAX3*, който има ключова роля за формирането на тъканите и органите през ембрионалния период. В изследването е установено, че ензимът - аденозин монофосфат (АМФ)-активирана протеинкиназа играе ключова роля в обмяната на веществата и поддържането на енергийния баланс. Той се активира при оксидативен стрес (майчина хипергликемия), подавайки сигнал за потискане експресията на гена *PAX3*.

3.3.3 Фетален период

Протича от деветата седмица на бременността до края й. Оформените органи през ембрионалния период нарастват и се диференцират. Бременността през този период е по-слабо чувствителна на неблагоприятни фактори на средата, но въпреки това някои органи като мозък и зрителен анализатор остават чувствителни на тератогенни

фактори, които могат да причинят тяхната незрялост или на плода като цяло, повишава се риска от хипо- и дисплазии, а фетусът често е с намалена жизнеспособност и адаптация, повишен риск от инфекции, родов травматизъм и др. Вродените аномалии през този етап се наричат:

- **Фетопатии –** примери за фетопатии са инфекциозни агенти като отново рубеолна и диабетна фетопатия, токсоплазмоза, сифилис, цитомегаловирус, хепатит[20], варицела при майката[21,22], медикаменти, радиация и др. В някои случаи вродените аномалии, не са с груб характер, но се проявяват различни функционални разстройства, забавено интелектуално и физическо развитие, загуба на тегло. На таблица 1 са представени зародишевите слоеве и свързаните с тях структури.

Таблица 1. Зародишеви листове и произхождащи от тях структури.

Зародишен лист	**структури**
ектодерма	Нервна система, зъбен емайл, епидермис, лигавица на устна кухина, ректум, анус, потни жлези, нокти, коса, фарингс,.
мезодерма	Скелет, скелетна и сърдечна мускулатура, бъбрек, полова система, епител на перитонеална, плеврална и перикардиална кухина, 3 Мезенхим - кръвна тъкан, микроглия, съединителна тъкан, гладка мускулна тъкан, съдов ендотел.
ендодерма	Храносмилателна система без споменатите по-горе с покривните клетки на всички жлези, които се отварят в храносмилателния тракт, включително черен дроб и панкреас; дихателна система – епител на дихателните пътища, ендокринна - покривните клетки на фоликулите на щитовидна жлеза, епител на околощитовидни жлези и на Лангерхансови острови и , слухова система - епителът на евстахиевата тръба и средното ухо, отделителна система – част от уретра и пикочен мехур.

Клетките на черния дроб и панкреаса се развиват от общ прекурсор[23]

3.4 Класификация на вродените аномалии

Вродените аномалии могат да се класифицират по няколко критерия – времето на поява, хистологичната характеристика, клиничното и социалното им значение и етиологията им[24.] Десетата ревизия на **М**еждународната **К**ласификация на **Б**олестите (МКБ 10) включва вродените аномалии в Глава XVII "Вродени аномалии (пороци на развитието), деформации и хромозомни аберации". Другите вродени разстройства като вродени решки на обмяната (ВГО) и наследствени болести на кръвта са класифицирани в други глави. Използваната и удобна за клиницистите МКБ 10, очаква своята 11-та

ревизия, която ще бъде достъпна 2017/2018 година. Малформативните заболявания са класифицирани по органи и системи, като са подредени както следва:

3.4.1 Класификации по МКБ10

- Вродени аномалии на нервната система.
- Вродени аномалии на окото, ухото, лицето и шията.
- Вродени аномалии на системата на кръвообращението.
- Вродени аномалии на дихателната система.
- Цепка на устната и небцето.
- Други вродени аномалии на храносмилателната система.
- Вродени аномалии на половите органи.
- Вродени аномалии на отделителната система.
- Вродени аномалии и деформации на костно-мускулната система.
- Други вродени аномалии.
- Хромозомни аберации некласифицирани другаде.

3.4.2 Класификация на аномалиите според времето на възникване

3.4.2.1 Малформации

Представлява първичен морфологични дефект, възникнал в резултат на вътрешно нарушен процес на развитие в клетките или тъканите на съответния орган или система. Според времето на поява биват отново гаметопатии или бластопатии, ембриопатии и фетопатии.

По отношение на морфогенезата малформациите се делят на:

- **с повишена морфогенеза –** развитие на допълнителни органи или части от тялото, например: полидактилия, трети бъбрек, повишен брой млечни жлези и др.
- **с нарушена или непълна морфогенеза:**

- аплазия или агенезия – нарушения водещи до отсъствие на морфологична структура поради липсваща пролиферация на клетки - (бъбречна агенезия, маточна аплазия и др.)
- хипоплазия - недоразвита морфологична структура поради намалена пролиферация на клетки - (хипоплазия на ларинкс, трахея или бял дроб)

- хиперплазия – свръх растеж на морфологична структура (вродена надбъбречна хиперплазия).
- непълно сращване на чифтни кости - (цепки на устните, небцето и лицето)
- непълно разделяне - (синдактилия)
- непълно преграждане
- непълно придвижване на органи

Дисплазия – отделена от изброените по-горе аномалии поради различен механизъм на поява - нарушена организация на клетките в тъканите – (ектодермална дисплазия, скелетни дисплазии, дисплазия на тазобедрена става - в различна степен плитко оформен ацетабулум, хипоплазия на ядрото на бедрената кост с ектопия на същото, по-силно изразен валгус в шийно-диафизарния ъгъл, водещи до вродена луксация на тазобедрената става.

3.4.2.2 Дисрупция

Представлява морфологичен дефект причинен от механично нарушение на нормалното развитие на една или повече части на тялото, възникваща след органогенезата. Могат да бъдат увредени различни части от тялото в резултат на съдови аномалии, например редукция на крайници. Дисрупциите са с ненаследствен характер, но могат да бъдат унаследени различни фактори водещи до предразположение към появата им.

3.4.2.3 Деформация

Представляват структурни аномалии на части от тялото причинени от механично въздействие, след органогенезата без редукция на части от тялото. Те са резултат от външни или вътрешни биомеханични причини действащи върху фетуса. Примери за деформации са луксациите на тазобедрената става след продължително седалищно предлежание, артрогрипоза, аномалии на матката, двуплодна бременност.

3.4.3 Класификация на вродените аномалии според клиничното им значение

3.4.3.1 Малки аномалии

Това са леки, козметични дефекти, които се срещат при около 4% от новородените. Не изискват лечение и нямат лоша прогноза. Малките аномалии трябва да се разграничават от нормалните варианти в популацията, като първите са с честота под 4%, а вторите при 4 или повече проценти. Малките аномалии могат да се наблюдават в рамките на много дисморфични синдроми. Наличието на 3 и повече малки структурни аномалии, налага търсенето на голяма такава. Наличието само на една малка аномалия не представлява клиничен проблем и се среща сравнително често.

- Една малка аномалия: 13,4% от новородените и при 3% е в комбинация с голяма.
- Две малки аномалии: 0,8% от новородените и в 11% са в комбинация с голяма аномалия.
- Три или повече: 0.5% от новородените и в 90% са свързани с голяма структурна аномалия.

3.4.3.2 Големи аномалии

Това са структурни аномалии с голямо клинично и медицинско значение, които водят до смърт или тежки функционални отклонения. Честотата им е висока при спонтанните аборти. При 2 до 3 % от фетусите в 20 г.с. се откриват големи аномалии, напр. дефекти на невралната тръба (ДНТ), бъбречна агенезия, гастросхизис, междукамерни дефекти и др. Големите аномалии биват:

- летални - мъртво раждане в половината от случаите или завършват летално до едногодишна възраст.
- тежки – живото-застрашаващи без медицинска намеса.

3.4.4 Класификация на вродените аномалии по брой засегнати системи или части на тялото.

3.4.4.1 Изолирани аномалии

Това са най-често срещаният тип вродени дефекти засягащи само една система или част от тялото, напр. цепки на устната/небцето, вроден сърдечен дефект, като обикновено са с мултифакторна природа и нисък риск от повторение.

3.4.4.2 Множествени аномалии

Това са аномалии засягащи няколко органа или системи, често съчетани с интелектуална недостатъчност. Могат да бъдат открити в рамките на:

- **Секвенция –** структурен дефект или механичен фактор водещ до вторични аномалии. Причината за възникването им е каскада от събития настъпили в резултат на първичен дефект. Пример за секвенция е тази на Pieree Robin. Наблюдава се микрогнатия, последвана от глосоптоза, водеща до незатваряне на небцето с оформяне на цепка, като в комбинация могат да причинят обструкция на дихателните пътища. Potter секвенцията (олигохидрамнион) се развива поради агенезия на бъбреците, автозомно-доминантно или автозмно-рецесивно бъбречно поликистозно заболяване и др. Изразява се в органни аномалии, аномалии на крайниците (синдром на русалката), характерен лицев дисморфизъм и белодробна хипоплазия.
- **Асоциация –** дължи се на комбинация от две или повече първични структурни аномалии на различни част от тялото, като честотата им на проява е недостатъчна за да бъдат дефинирани като отделна нозологична единица. Известен пример е CHARGE асоциацията, в 2/3 свързана с мутация в *CDH7* гена - (Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 – роля в транскрипционната регулация). Акронимът CHARGE отразява основните белези на асоциацията: **C**oloboma, **H**eart defect, **A**tresia of the choanae, **R**etardation of growth and/or development, **G**enital and/or urinary defects and **E**ar anomalies and/or deafness. Децата с тези аномалии биха могли да оцелеят и да се развиват при добро мултидисциплинарно обгрижване. Друга известна асоциация е VACTERL или още (VATER) асоциацията. Не е идентифицирана специфична генетична причина за възникването на асоциацията. VACTERL може да се види при някои хромозомни дефекти като тризомия 18 и се наблюдава по-често при бебета на диабетно болни майки. Най-вероятно причината за състоянието е мултифакторна. Акронимът отразява следните аномалии: **V**ertebral anomalies, **A**nal atresia, **C**ardiac defects, **T**racheoesophageal fistula and/or **E**sophageal atresia, **R**enal and **R**adial anomalies and **L**imb defects. При мултидисциплинарен своевременен подход, децата с VACTERL асоциация, могат да имат нормално развитие и интелект.

3.4.4.3 Дисморфични синдроми

Определението за синдром включва съвкупност от признаци, свързани с болестно състояние и проявяващи се едновременно достатъчно често за да бъдат определени като отделна нозологична единица. При дисморфичните синдроми има

повтаряща се комбинация от няколко аномалии засягащи две или повече различни в ембриологично отношение тъкани. Могат да бъдат хромозомни (Даун синдром), моногенни (Марфан синдром), екзогенно обусловени (инфекциозни, фетален алкохолен синдром) и идиопатични. Дисморфични синдроми могат да се подозират при слепота, глухота, нарушен растеж и пропорции на тялото, вродени аномалии, дисморфични белези, нарушено, пубертетно, невро-психично, речево развитие и др.

3.4.4.4 Адитивни дисморфични синдроми

Това са комбинации от етиологично различни голяма и няколко малки аномалии, водещи до поява на дисморфични черти с най-често мултифакторна генеза[4].

3.4.4.5 Политопни зонови дефекти

Това са дефекти, които засягат определени сомитомери (сомити) на ембриона и съответните органи и части на тялото развиващи се от съответният сомит. Сомитите са с мезодермален произход и се подразделят на склеротоми, миотоми, синдетоми и дерматоми, образуващи прешлените на гръбначния стълб, гръдния кош, и част от тилната кост, скелетните мускули, хрущяли, сухожилия и кожа (на гърба).

3.4.5 Класификация по етиология на вродените аномалии

През 2005 год. е преложена практична етиологична класификация на вродените аномалии от Wellesey и колектив.[25 - 28]

- **Хромозомни (Chromosome - C)** – микроскопски видими небалансирани хромозомни аномалии, напр. Даун синдром, синдром на Едвардс, синдром на Патау.
- **Микроделеционни (Microdeletion - MD) –** субмикроскопски хромозомни аномалии, монородителска дизомия и импринтинг мутации, напр. синдрома на Прадър-Вили и синдром на Енджелман;
- **Тератогени (Teratogens - T)** - тератогенни фактори и пренатални инфекции, напр. фетален алкохолен синдром, медикаменти, радиация, инфекции.
- **Де ново възникващи доминантни мутации (New Dominant - ND),** напр. ахондроплазия;
- **Наследствени болести, некласифицирани като de novo доминантни мутации (Familial - F),** напр. синдрома на чупливата Х хромозома;
- **Синдроми (Syndrome - S)** - ненаследствени, не-хромозомни синдроми, напр. синдрома на Кабуки;

- **Изолирани аномалии (Isolated - I)** - гастросхизис, цепка на устната/небцето; сърдечни дефекти.
- **Множествени аномалии (Multiple anomalies - M)** - аномалии, засягащи повече от една система, с неясна етиология и без патогенетична връзка помежду им. Напр. VACTERL – и CHARGE - асоциациите.

3.5 Етиология на вродените дефекти на развитието.

Според данни на СЗО от 2016г. около 50% от вродените аномалии не могат да бъдат свързани с конкретна етиология[29]. Биха могли да имат 3 основни причини: генетични, фактори на околната среда и комбинация от двете – мултифакторни[30.] Процентното разпределение на причините за възникването на ВА търпи корекции според данни от различни проучвания в различни ареали: според някои е установено, че етиологията на ВА е генетична в 30-40% от случаите и свързана с факторите на околната среда в 5 до 10%. Сред генетичните причини, хромозомните аномалии представлява около 6%, моногенните нарушения около 25% и от 20 до 30% са свързани с мултифакторната (включваща комбинирани генетични и негенетични причини) генеза[31]. Според други източници за чисто генетична се смята етиологията на около 12-25% от вродените дефекти, като от тях най-голяма е групата на хромозомните аберации[32-35]. Според трети източник процентното изражение на генетичните аномалии е 25% от всички вродени дефекти, като голямо значение се отдава на възрастта на майката и кръвнородствените бракове. ВА свързани с факторите на средата представляват около 15%, а мултифакторните ВА произтичащи от взаимоотношенията между гени и околна среда са около 60% от всички аномалии при условие, че ВА с неясна етиология са също включени в тази група[36]. Това показва голямото значение на разкриването на етиологичните причини за ВА и провеждането на повече изледвания в областта, с цел по-добра профилактика и терапия на вродените дефекти при отделните случаи.

3.5.1 Генетична етиология на вродените аномалии

Сред генетичните фактори отговорни за развитието на ВА са три основни: големи и малки хромозомни аберации включващи дозо-зависими ефекти, моногенни дефекти и митохондриални ДНК мутации. Към първите спадат:

3.5.1.1 Хромозмни аберации (ХА)

В около 30% от случаите се срещат аберации на половите хромозоми, 25% се падат на автозомни анеуплоидии, а останалият процент са структурни преустройства[32.] ХА могат да бъдат с различен размер, като водят до доза-зависим ефект, в резултат на който възникват ВА, или казано по друг начин се дължат на излишък или недостиг на хромозомен материал, включително небалансирани пренареждания[37.] Приблизително 1 на 200 живо родени деца имат хромозомна аномалия[38,39]. В случаите на перинатална смъртност, честотата варира между 5 и 10%, а при спонтанните абортите в първия триместър са повече от 60%[40-42]. Излишъкът или липсата на генетичен материал може да възникне както при бройни така и при структурни аберации.

- **Бройните хромозомни аберации**

Делят се на полиплоидии (увеливение на числения набор на хромозомите кратно на хаплоидния) и анеуплоидии (наличие или загуба на хромозома от хромозомната двойка). Аберацията може да бъде представена във всички клетки на организма или в определени клетъчни линии (мозаицизъм)[43,44]. Триплоидиите се установяват при около 2% от диагностицираните бременности[45,] възникващи обикновено при грешки на оплождането. Полиплоидиите, както и монозомиите с изключение на синдром на Търнър са несъвместими със живота, поради което вродените аномалии с добавен генетичен материал при определена хромозомна двойка са по-често срещани в клиничната патология. Според някои данни тризомия 16 е най-честата анеуплоидия, която обаче завършва обикновено със спонтанен аборт през първият триместър[46-48,] а най-често срещаната тризомия съвместима със живота е тризомия 21 (Даун синдром), следвана от тризомия 13 и тризомия 18, които в повечето случаи завършват със спонтанни аборти, мъртво раждане, а живо родените в повечето случаи загиват до края на първата година след раждането. Честотата на посочените полималформативни синдроми съчетани с интелектуална недостатъчност е показана на таблица 2[49].

Таблица 2. Честота на най-честите полималформативни синдроми съчетани с интелектуална недостатъчност

Тризомия 21(Даун синдром)	1 : 800
Тризомия 18(Едвардс синдром)	1:3500 и 1:8000

Тризомия 13(Патау синдром)	1 : 6,500

- **Структурните хромозомни аберации**

Могат да включват транслокации, инверсии, делеции, дупликации, изохромозоми, ринг хромозоми и др. ВА възникват като резултат от появила се de novo аберация или унаследена от родителите. Структурните преустройства мога да бъдат балансирани (без промяна в количеството на генетичния материал) или небалансирани, като балансираните са без фенотипни прояви, но могат да водят до такива при следващото поколение, превръщайки се в небалансирани. Небалансираните преустройства резултират във ВА предизвикани най-често от делеции или дупликации. Голяма част от тях остават неразкрити поради малкия им размер, но отново са свързани с дозо-зависим ефект. Това са:

- **Микроделеционни и микродупликационни синдроми.**

Представляват аберации с размер под 5 Mb и трудно могат да се идентифицират с рутинен цитогенетичен анализ. ВА при тези аберации често са съчетани и с интелектуална недостатъчност. Примери за микроделеционни и микродупликационни синдроми са илюстрирани на таблица 3.

Таблица 3. Примери за микроделеционни и микродупликационни синдроми

синдроми	родителски произход	локализация	симптоми
Прадер-Вили синдром	бащин	del15q11-13	Затлъстяване, хипотония, лицеф дисморфизъм, ОКР, интелектуална недостатъчност и др.
Ангелман синдром	майчин	del15q11-13	Макростомия, прогнатия, пароксизмален смях, интелектуална недостатъчност и др.
Ди Джорджи синдром	Без значение	del22q11	CATCH – акроним: сърдечни аномалии, лицев дисморфизъм, тимусна аплазия, цепка на небцето, хипопаратиреоидисъм.

Милър-Дикър синдром	Без значение	del17p13.3	ВА, лизенцефалия, интелектуална недостатъчност
Смит-Магенис синдром	Без значение	del17p11.2	Лицев дисморфизъм, глухота, очни аномалии, интелектуална недостатъчност
Уилямс-Бойран синдром	Без значение	del7q11.23	Лицев дисморфизъм интелектуална недостатъчност, сърдечни аномалии
WARG синдром	Без значение	del11p13	Тумор на Вилмс, аниридия, генитоуринарна дисплазия, интелектуална недостатъчност
Синдром на котешкото око	Без значение	Inv dup-22q11	Колобома, атрезия на хоаните, лек лицев дисмофизъм, интелектуална недостатъчност

- **Субтеломерни аберации**

Теломерите са изключително динамични хромозомни структури. Те са от съществено значение за геномната стабилност, важни са за репликацията и участват в много ключови биологични процеси, включително регулиране на клетъчния цикъл, клетъчното стареене, придвижване и локализация на хромозомите в ядрото, и транскрипционна регулация на субтеломерни гени[50, 51]. Краищата на хромозомите при човека са представени от високо консервативни участъци от минисателитна ДНК от тандемно повторени 6 нуклеотида $(TTAGGG)_n$[52], чиято репликация се осигурява от ензима теломераза активна само в стволовите, половите и раковите клетки. В близост до теломерите е локализирана друга фамилия, хипервариабилна минисателитна ДНК. Тези субтеломерни повтори не са консервативни при еукариотите и функцията им е неясна. При широка гама от еукариотните организми са се развили специализирани функции, включващи теломерна и субтеломерна ДНК. Например при трипанозомите особеностите на субтеломерните гени често осигуряват разнообразие за повърхностните антигени[53]. Друг пример са субтеломерни генни семейства предоставящи селективни предимства за някои щамове дрожди[54.]

Субтеломерните райони са участъци богати на псевдогени и повторени секвенции и споделят висока хомоложност помежду си[55, 57.] Освен това при протичане на мейозата хромозомите инициират сдвояването си от теломерите и субтеломерните участъци. Според някои данни субтеломерните райони играят ключова роля в

процесите на разпознаване на хомоложните хромозомни участъци и последващо свързване по време на началната фаза на мейозата[58.] Установена е и по-висока честота на рекомбинация в теломерните райони[59]. Поради всички изброени причини субтеломерите се смятат за предилекционни места за възникване на нехомоложен кросинговър. Тъй като са райони относително богати на гени и често участват в хромозомни преустройства[60] са натрупани и голям брой доказателства за участието на трудноидентифицируеми субтеломерни хромозомни аберации в етиологията на ВА и интелектуалната недостатъчност. Пример за такива субтеломерни хромозомни аберации е 9q субтеломерен делеционен синдром, като делецията резултира в хаплоинсуфициенция на *EHMT1* гена (euchromatin histone methyl transferase 1 gene). Синдромът се характеризира с тежка интелектуална недостатъчност, хипотония, брахицефалия, лицев дисморфизъм, сърдечни аномалии, поведенчески проблеми и др.[61]. Друг пример е 5q субтеломерната делеция водеща до множество малки аномалии, забавено развитие, хипотония и др.

Диагностицирането на субтеломерните преустройства с рутинна цитогенетика е трудно, от една страна поради малките им размери, а от друга поради трудното им оцветяване по Гимза. Подходящ за диагностика метод е FISH анализът. Пълен комплект от теломер-специфични FISH сонди, предназначени за хибридизиране към уникалните субтеломерни райони на всяка човешка хромозома първоначално е описан през 1996 .г, и е актуализиран през 2000г.[62]. Съобщават се различни данни за субтеломерни аберации, според някои от които този тип преустройства са открити при 5,1% от 254 деца с интелектуална недостатъчност, дисморфизъм и малформации[63.] Според други изледвания, при субтеломерния скрининг на 71 новородени с вродени малформации, се откриват скрити субтеломерни преустройства при 9,86%[64.]

3.5.1.2 Моногенни дефекти с менделов тип унаследяване

Те са резултат от промени в един ген, възникващи във всички клетки на тялото. Мутациите могат да бъдат различни видове: nonsense, missence, frameshift, splice, амплификация на тринуклеотидни повтори, причиняващи молекулни болести. Множествените вродени аномалии са често резултат от мутации, променящи функцията на гени важниза ранното ембрионално развитие, като по този начин се нарушават развитието на различни органи и системи.

Въпреки че са сравнително редки, моногенните дефекти засягат милиони хора по целия свят. Според данни на СЗО от 2016г. известните моногенни заболявания при

човека са над 10 000. Глобалното разпространение на всички моногенни заболявания при раждането е приблизително 10/1000. В Канада например, моногенните болести взети заедно представляват приблизително 40% случаите в педиатричната практика[65]. Според начина на унаследяване моногенните заболявания могат да се класифицират в 4 основни категории: автозомно-доминантни с честота от 2 до 10/1000, автозомно-рецесивни – 2 до 5/1000, Х – свързани – 1 до 2/1000 и митохондриални. 1/5000[66.] Моногенните болести са каталогизирани в „Mendelian Inheritance of Man"[67] McKusick, 1998), достъпен онлайн (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim).

- **Автозомно-доминантните дефекти** се проявяват в хетерозиготно състояние с риск за следващото поколение 50%, като част от тях са разпознаваеми в неонаталния период например ахондроплазия, а други като болест на Хънтингтон, автозомно-доминантна церебеларна атаксия, се проявяват с напредване на възрастта. Пример за синдром с автозомно-доминантно унаследяване и ВА е синдром на Ди Джорджи.
- **Автозомно-рецесивните дефекти** се проявяват в хомозиготно състояние с 25% риск за следващото поколение. Примери за ВА с автозомно-рецесивно унаследяване са Мекел-Грубер синдром, проявяващ се с тежки аномалии на ЦНС, бъбреци, очни и сърдечни аномалии, полидактилия и др.,[68,69] форма на синдром на Карвахал – палмо-плантарна кератодерма с кардиомиопатия.
- **Х – свързаните нарушения** могат да се унаследят рецесивно или доминантно, като при първите засегнатите са основно мъже, унаследили Х хромозомата от майка си, която е здрав носител на мутацията. Примери са дефекти с Х –рецесивно унаследяване са Х свързана рецесивна ихтиоза, синдром на чупливата Х хромозома и др. Примери с доминантно унаследяване са синдром на Рет, синдром на Голц (фокална дермална хипоплазия, асоциирана с нисък ръст и епилепсия).

3.5.1.3 Вродените дефекти с неменделиращо унаследяване

- **Болести с митохондриално унаследяване** - предават само чрез майката и засягат основно ЦНС, сърце и скелетни мускули, като обикновено са тежки и прогресиращи. Наричат се още болести на окислителното фосфорилиране. Клиничната картина често е вариабилна. Примери са синдром на MELAS, синдром на NARP, синдром на Leigh и др.
- **Заболявания свързани с геномен инпринтинг и еднородителска дизомия –** Те са причина за отклонения от традиционния тип унаследяване на заболяванията.

Геномният инпринтинг е епигенетичен феномен, при който се наблюдава диференцирана експресия на даден ген в зависимост от родителския произход, като към момента са открити сравнително малко такива гени. Нуклеотидната последователност на съответните гени не се променя. Повлияна се само експресията на гените, като епигенетичната модификация се осъществява по време на гаметогенезата или ранните етапи от развитието на зиготата. Импринтингът (белазването) на гена действа по-често като инактивира импринтирания ген, а нормалното развитие на ембриона зависи от функционирането на алела на другия родител. Инактивирането е обратимо и не представлява ДНК мутация. Импринтингът на даден район се регулира от „импринтинг контролен център", чиито мутации също могат да доведат до заболявания. Молекулните механизми на този феномен не са напълно изяснени, но въпреки това е установено, че метилирането играе важна роля. Хиперметилираните райони са временно инактивирани, а хипометилираните обратното. Значението на геномния импринтинг в етиологията на моногенни болести и дисморфични синдроми се илюстрира с някои примери: синдром на Прадер –Вили (унаследен от бащата) и синдром на Ейнджълман (унаследен от майката) са микроделеционни синдроми с дисморфични белези, като гените отговорни за развитието им са локализирани в един и същи критичен район на 15-та хромозома – 15q11-12, но са противоположно импринтирани. Други дисморфични синдроми свързани с геномният импринтинг са синдром на Бекуит-Видеман.

Еднородителската дизомия е състояние на унаследяване на двете хромозоми от дадена хомоложна двойка само от единия родител. Биват изодизомия при унаследяване на две хромозоми, идентични копия само на единия хомолог. При наличие на две хомоложни хромозоми унаследени само от единия родител се наблюдава хетеродизомия. Тук отново унаследяването е нетрадиционно. При случаи на деца с муковисцидоза е установена майчина изодизомия на 7-ма хромозома. Примери тук са и синдромите на Прадер-Вили и Енджелман, които могат да възникнат и по този механизъм, както и при мутации в импринтинг центъра и др. Освен свързана с автозомите, еднородителска дизомия е установена и при случай на Хемофилия А предадена от баща на син.

- **Заболявания свързани с гонаден или соматичен мозаицизъм –** Това са състояния, при които в един индивид или в една тъкан, присъстват две или повече клетъчни линии. Гонадният мозаицизъм се равива при възникване на мутация в стволова клетка предшественик на гаметите, което е предпоставка за развитие на моногенно заболяване в семейство със здрави родители. Случаи с подобно

унаследяване са документирани при Остеогенезис имперфекта, характеризираща се с няколко клинични форми, една от които летална. Соматичният мозаицизъм се проявява когато настъпи мутация в соматични клетки от определени части на тялото, като някои от клетките са с нормални, а другите с мутантни алели на дадения ген. Такива заболявания не се унаследяват. Подобни случаи са описани при синдром на Марфан, невробромatоза тип 1 и др.

- **Заболявания свързани с унаследяване на динамични мутации** – те са резултат от експанзия на тринуклеотидни ДНК последователности в до момента ограничен брой гени. Характерен за тези болести е феноменът антиципация, при който във всяко следващо поколение симптоматиката е по-тежка и по-ранно проявена. Това се случва поради увеличаване броя на тринуклеотидните повтори характерни за всяко заболяване, през ово- или сперматогенезата. Примери за такива заболявания са Хорея на Хънтингтон, миотоничма дистрофия, синдром на чупливата Х хромозома и др., като при изброените се наблюдава и ефект на родителският произход по отношение на проявата и тежестта на симптоматиката.

3.5.1.4 Генетичен полиморфизъм

Генетичният полиморфизъм стои в основата на индивидуалните различия по отношение на множество мултифакторни белези, както и по отношение на предразположеността към различни заболявания. Той представлява две или повече алтернативни форми на хромозоменя локус, които се различават по отношение на нуклеотидната последователност, или по брой повтарящи се нуклеотидни единици. Голям участък от геномната ДНК, (30-60%) съдържа повторени ДНК последователности. При независими проучвания проведени през 2004-та година[70, 71], върху групи здрави индивиди чрез цялостен геномен скрининг, се установиха стотици вариабилни региони. Вариациите в човешкият геном са няколко вида:

- **SNP's (Single Nucleotide Polymorphism - еднонуклеотидни полиморфизми)**

Това са най-често срещаните полиморфизми в човешкия геном и включват замяна на един нуклеотид с друг. Тези полиморфизми могат да бъдат локализирани както в кодиращи така и в некодиращи участъци на гена, като могат да променят (несинонимни) или не (синонимни), аминокиселиния състав и съответно да допринесат за появата на различни заболявания. Именно заради това SNP's са по-често срещани в некодиращи участъци. Въпреки това биха могли да окажат въздействие повлиявайки сплайсинга, транскрипцията и други процеси. SNP's са изключително важен елемент в

подходите на персонализираната медицина. Все по-често се използват за идентифициране на неблагоприятни варианти на много гени с цел превенция и профилактика на социално значими заболявания. Други известни полиморфизми са:

- **Минисателити**

Съставени са от 10-60 нуклеотида, тандемно повторени от 5 до 50 пъти. Срещат се на повече от 1000 места в човешкия геном и се отличават с висока мутабилност и голямо разнообразие в популациите. Минисателитите се срещат в центромерните и теломерните райони на хромозомите и предпазвайки ги от увреждане. Често са класифицирани като VNTR (**V**ariable **N**umber of **T**andem **R**epeats)[72.] Минисателитите имат роля и на регулатори на генната експресия (например при транскрипция, алтернативен сплайсинг или инпринтинг контрол).

- **Микросателити**

Съставени са от основна структира от 1-6 нуклеотида повторена от 10 до 60 пъти. Срещат се на хиляди места в човешкия геном. Имат висока честота на мутиране и обезпечават генетичното разнообразие[73]. Микросателити често са наричани къси тандемни повтори **S**hort **T**andem **R**epeats (STRs) или прости повторени последователности **S**imple **S**equence **R**epeats (SSRs).

Минисателитите и микросателитите са широко използвани за ДНК профилиране и особено при тестване за бащинство и за нуждите на криминалистиката. Използват се и като маркери при изследване и идентифициране на кандидат гени за определено заболяване. Имат приложение и в популационната генетика.

Благодарение на молекулното кариотипиране са открити неочаквано голямо количество, структурни вариации в човешкият геном. Тук се включват субмикроскопски микроинсерции-делеции (indels), дупликации, инверсии и мутации променящи рамката на четене (frameshift)[74]. Наи-често срещани в човешкия генома са вариантите с размери от 1 до 1000 bp (Base Pairs) и заедно с SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) наброяват най-малко 10 милиона[75].

Молекулното кариотипиране даде възможност да бъдат изучавани и вариациите в броя на копията (CNVs), които 2007 година бяха посочено от списание Science като „голям пробив"[76.]

- **Вариации в броя копия**

Вариаците в брой на копията са най-разпространения вид структурните изменения в човешкия геном и допринасят значително за геномната хетерогенност. През последните

години са открити стотици нови вариации в повторените ДНК последователности, като се смята, че вариациите в броя на копията (CNVs) са толкова важни за геномното многообразие колкото и еднонуклеитидните полиморфизми (SNPs). Понастоящем CNVs се дефинират като ДНК сегмент от 1Kb или по дълъг, присъстващ вариабилен брой пъти в сравнение с референтен геном[77]. Някои от идентифицираните CNVs нямат доказано влияние върху фенотипната изява, други са били категорично свързана с развитие на заболявания. Данните също така показват, че взаимодействието с допълнителни генетични фактори или околната среда, могат да повлияят фенотипната проява на някои CNVs. Вариации в броя на копията са открити във всички човешки популации, както и в други видове бозайници[78]. При анализ на CNVs в човешки геном и този на шимпанзе е установена потенциално по-голямата роля на CNVs в еволюционния процес, в сравнение с еднонуклеотидните замени[79]. Сравненията показали, че има над два пъти повече нуклеотиди, участващи в структирата на CNVs, отколкото в SNPs - 2,7% в сравнение с 1,2%. Освен това, научните изследвания на Ченг и сътр. от 2005 разкриват, че приблизително една трета от CNVs наблюдавани в човешкия геном са уникални за нашия вид[80]. Допълнителни изследвания в областта разкриват и връзката на CNVs с редица генетични заболявания при хората[81]. Друго проучване идентифицира инверсия водеща до положителна селекция при хората[82]. Този вариант включва обръщане на участък от 900 Kb, локализиран между дуплицирани секвенции, които се различават значително по броя на копията си. Проучването, анализиращо десетки хиляди проби, показва, че жените, носителки на тези инверсии имат повече деца от останалите. Хаплотиповете на носителките и неносителките на тези инверсии са били изследвани в различни популации, а механизмът на възникване на този полиморфизъм остава неясен. Според изследвания за потенцялната роля на CNVs в еволюцията[77] е установено, че за разлика от делециите свързани с загуба на генетичен материал, дупликациите могат да доведат до поява на нови функции. Друг пример за действие на естественият отбор е гена за слюнчената амилаза *AMY1*, показващ генетичните различия между индивидите и популациите. Участва в смилането на скорбялата, като броят копия при отделните индивиди може да варира от 1 до 10 влияейки на нивата на амилазата[83]. Отчетена е значителна разлика между вариациите в различните популации в зависимост от съдържанието на скорбяла в диетата. Повишен брой копия е наблюдаван в популации с висококоскорбялна диета. Тази положителна селекция вероятно води до оптимизиране на храносмилателните процеси и предпазване от стомашно-чревни заболявания.

Според публикувани изследвания, CNVs обикновено лежат извън кодиращи последователности и консервативни регулаторни елементи и включват най-малко 200 базови двойки, повтарящи се без изменения в няколко животински вида, включително хора, плъхове и мишки[84]. Функционалните участъци с най-голяма честота на CNVs са гените, участващи в клетъчната адхезия, възприятието за мирис и отговора на химически дразнители. Тези изводи са направени и в други проучвания за разпределение на вариациите в броя на копията[85]. В допълнение е установено, че гените участващи в клетъчната сигнализация и пролиферация, както и тези, участващи в регулацията на процесите на фосфорилиране имат ниска честота на CNVs, което води до извода, че функционирането им е свързано с дозо-зависимия генен ефект особено през ембрионалният период на развитие и потенциалът на тези гени като онко- или туморсупресорни гени. Проучването на CNVs и връзката им с онкологичните заболявания се развиват бързо. Молекулярното кариотипиране, секвенирането от следващо поколение и интегративните анализи обещават разкриване на нови CNVs свързани с тези болести, за които предстои да се разбере дали са подходящи за таргетна терапия.

Натрупването на голямо количество данни от различни мащабни асоциативни проучвания върху ролята на CNVs, доведе до определяне на определени генотип-фенотипни корелации, поради което първоначално приетите за нормално съществуващи CNVs, могат да добият смисъл на свързани с повишени рискове от развитие на мултифакторни заболявания или генетични болести с непълна пенетрантност. Поради това терминът CNVs се използва за описване на вариации в броя на копията както при здрави контроли, така и при пациенти.

- **Честота на CNVs в популацията**

Преди години беше започнато съставяне на пълен каталог на наличните CNVs в човешкия геном в сътрудничество на международни изследователски лаборатории. Проведено изследване в рамките на проекта HapMap върху мултиетническа популация, обхващащо 270 ДНК проби, разкри общо 1447 дискретни CNVs. Взети заедно, обхващат приблизително 360Mb (megabases), или 12% от човешкия геном. Проектът HapMap показва, че CNVs покриват сумарно повече нуклеотиди в човешкият генома от SNPs, което подчертава значението им за генетичното разнообразие[79]. Геномната карта

на вариациите в броя на копията разкрива, че процентът на хромозоми на даден индивид, съдържащи CNVs варира от 6% до 19%[77]. Други данни от секвениране на човешкият геном показват, че инсерциите и делециите са отговорни за 22% от вариациите и покриват като количество обхванати нуклеотиди 74%[86]. Според проучване от 2013г., след извършване на ретроспективен преглед на клиничните данни и тези от микрочипова СГХ на 342 деца с неизяснено забавяне в развитието/ИН, са открити патогенни CNVs в 13,2% от пациентите. Сравнени са фенотипните характеристики на пациенти с клинично значима CNV с тези без патологични варианти. Вродени аномалии, особено сърдечни дефекти, микроцефалия, нисък ръст и невиреене са значително по-чести при деца с патологични CNVs, в сравнение с децата с нормални резултати от СГХ[87].

Друго изследване проведено върху 50 деца с аутизъм посредством микрочипова СГХ, разкрива в 88% (44 деца) от случаите различни генетични аберации и CNVs. Небалансирани геномни пренареждания, включително делеции и дупликации, са открити в 23 от 44-те случая (52%). В допълнение са изследвани 54 деца с идиопатична умствена изостаналост и вродени малформации (31 момчета и 23 момичета) без нарушения от аутистичният спектър. Делеции и дупликации, засягащи различни региони на Х хромозомата, са открити в 11 от 54-те деца (20,4%)[88].

Няколко публикации през 2014 година разкриват, че при група от 79 деца с ИН, са установени патологични CNVs, като при 22-ма от пациентите са открити 26 патологични или вероятно патологични CNVs. Осем от тях съответстват на известни микроделеционни/микродупликационни синдроми, а 17 не са свързани с описани нозологични единици[89].

При група от 116 пациенти получените данни за CNVs и клиничните характеристики на пациентите са анализирани в търсене на генотип-фенотипни корелации. При 27 от пациентите (23,3%) са установени патологични варианти (21 делеции, 3 дупликации и 3 случая с делеции и дупликации едновременно). Разкрива се значима връзка между установените CNVs с ранната проява на симптомите (преди 1-годишна възраст) и наличието на малформации и дисморфизми[90].

При проучване публикувано 2015г. включващо 40 чилийски пациенти с нормален кариотип или недобре характеризирани аномалии са открити CNVs в 72.5% от пациентите. В 25% от засегнатите вариантите били патологични, а в 2,5% - с неясно клинично значение. Тестваните пациенти са избрани по два или повече критерии: големи вродени аномалии, лицев дисморфизъм, забавяне на развитието и

интелектуална недостатъчност. Изследването показва значението на микрочиповата СГХ за поставяне на точна диагноза, оптимизиране на лечението и разкриване на нови етиологични причини за възникването им[91.]

Друго изследване върху 149 ливански пациенти с ИН и забавяне в развитието, включващо и 99 здрави контроли, показва наличие на патологични CNVs в 12,1% от пациентите[92].

При изследване на 66 деца с лека форма на ИН, посредством микричипова диагностика, са идентифицирани CNVs в 20 от пациентите. При 9 от тях (~12%), вариантите са категорично свързани с клиничния фенотип, а в 6 от тях са с вероятно патологична природа[93].

Откриват се все повече варианти в броя на копията свързани с различни редки или по-чести състояния. Анализ публикуван 2016 година включващ 120 пациенти със синдром на Поланд (СП) разкрива редица редки CNVs обхващащи кандидат гени, за по-нататъшна оценка[94]. Друго проучване идентифицира 15 CNVs в седем от 14 случая със синдром на Клипел-Треноне (вродени съдови аномалии) съдържащи гени свързани с различни процеси на ембриогенезата[95].

Сред някои описани вече варианти свързани с повишен риск от развитие на шизофрения и други невро-психични разстройства е описан и един свързан с делеция от 1,6Mb в 3q29, за който се смята, че повишава 40 пъти риска от развитие на тези заболявания[96].

Всичко описано до момента показва голямото разнообразие на вариациите в броя копия в популациите както и възможното им участието в патогенезата на много мултифакторни заболявания. Това предполага, че те могат да бъдат използвани като източник на информация за изучването на генетичните характеристики на народите[97-101], и еволюционното им развитие.

Поради очевидно различното им клинично значение CNVs могат да бъдат подразделени на нормални, варианти с неясно клинично значение и патологични[74,78,102,103]. Въпреки множеството натрупани данни ди момента една немалка част от вариациите в броя копия остават с неизяснено значение както от научна така и от клинична гледна точка, което налага подробното им изследване при пациентите. Изследването на CNVs е достъпно и се извършва с микрочипов ДНК анализ, съчетаващ два типа технология: таргетни чипове и чипове за цялостен геномен анализ. Развитието на микрочиповите ДНК технологии преминава през различни етапи като се започва със създаването на таргетни чипове съставени от BAC клонове (**B**acterial **A**rtificial

Chromosome), покриващи райони на известни микроделеционни/микродупликационни синдроми[104, 105.] Следват чиповете за цялостен геномен анализ (ЦГА)[70,106]. По-късно се предлагат т. нар. “tilling” чипове покриващи целия геном, но съставени от застъпващи се клонове[107,108], следвани от високорезолютивна платформа, с едноверижни олигонуклетидни фрагменти вместо BAC клонове[109-112]. Мненията в научните среди по отношението на използването на таргетни чипове и такива за цялостен геномен анализ са различни. Според някои изследователи ЦГА крие риск от трудно интерпретиране на огромното количество получена информация, особено по отношение на патологичните варианти и намирането на генотип-фенотипни корелации поради наличието на голям брой CNVs с неясно клинично значение или срещащи се при здрави индивиди[105,113]. Според други източници предимствата са във възможността да се скринира целия геном, позволява идентифициране на нови микроделеционни и микродупликационни синдроми[114-120] и би могло да се удвои откриването на патологични варианти[121]. Важно при идентифицирането и определянето на клиничното значение на CNVs е правилното им класифициране като нормални, патологични или такива с неясно клинично значение, което е и обект на изследване в дисертационния труд с цел откриване на нови генотип-фенотипни корелации.

- **Класифициране на вариантите в броя копия.**

- **Нормални CNVs –** това са вариации в броя на копията характерни за здрави лица и срещащи се при повече от 1% от популацията. Информация за установените CNVs при хиляди здрави индивиди са достъпни в обществени бази данни, като (Database of Genomic Variants, http://projects.tcag.ca/variation/)[122]

- **Патологични CNVs –** това са вариации в броя на копията, за които е известно, че причиняват заболяване. В някои случаи, вариантът е ясно клинично свързан със симптоматиката на пациента, а в други идентифициран случайно и изисква допълнителна медицински консултации и тестове. Патологични по природа са вариантите обхващащи райони свързани с известни микроделеционни/ микродупликационни синдроми. Силен индикатор за клинично значение са няколко фактора: големите размери на CNVs, ниската честота на поява, припокриването на голям брой гени и де ново възникването им при пациента[77,123,124]. Идентифицираните аберации се валидират в последствие с друг молекулен метод, като по-големите преустройства (делеции над 40Kb и дупликации над 10Mb) могат да се валидират с метафазен FISH. При по-малки аберации може да се приложи интерфазен FISH, като

при наличие на дуплициран уастък в различни хромозоми, с метафазен FISH, могат да се детектират и по-малки по-размери преустройства[102]. За валидиране на малки по размер преустройства могат да се използват и други методи като: количествен PCR (Polymerase Chain Reaction) метод, MLPA, микросателитно генотипиране или друга микрочипова платформа[74].

- **CNVs с неясно клинично значение –** според Lee и сътрудници., при този тип вариации в броя на копията е изключително важно да бъде установено дали са унаследени или де ново възникнали. За определяне значението на съответния вариант е необходимо тестване и на родителите, което по една или друга причина невинаги е възможно. Ако така или иначе аберацията бъде идентифицирана при здрав родител е твърде вероятно да се касае за нормален вариант. При някои установени CNV, покриващи добре идентифицирани критични райони, изследването на родителите може да не бъде необходимо за установяване на генотип-фенотипните корелации. При възможност за изследване на родителите е добре да бъдат тествани със същата СГХ платформа. При липса на възможност това да бъде направено може да се използва друг валидиращ метод, с който да бъдат тествани пациентът и родителите. Такива методи са количествен PCR, MLPA и FISH, като последният е особено подходящ, тъй като предоставя информация за хромозомното разпределение на съответния район и спомага за установяване на рекурентния риск в семейството. Друг важен критерии е установената ниска мутабилност на CNVs идентифицирани при здрави индивиди[77] и факта, че се унаследяват непроменени. При определяне на клиничното значение на даден вариант винаги трябва да се взимат предвид и състояния на мозаицизъм, непълна пенетрантност и вариабилна експресивност. При генетичното консултиране трябва да се вземе под внимание и факта, че при използване на методи с по-висока резолюция може да се установят различни точки на скъсване при унаследените варианти, което да промени фенотипната изява[102]. Ненаследствените или де ново възникнали варианти трябва впоследствие да бъдат съотнесени към базата данни, включваща откритите при засегнати и здрави индивиди CNVs за да се установи тяхната природа. Такива бази данни са DGV, UCSC (база данни, създадена от Genome Bioinformatics Group към University of California at Santa Cruz - http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway) и др. [122; 125.] Към 18 март 2007г., DGV (Database of Genomic Variants) съдържаща 6,482 CNVs, от 40 различни публикувани проучвания. Голяма част от тях са от 40 до 100 Kb. Каталогизираните CNVs обхващат над 500 Mb от геномната ДНК, представляващи близо 20% от човешкия референтен геном. При установяване на клиничното значение

на дадените варианти могат да се изключат идентифицираните нормални CNVs и останалите да бъдат разглеждани като възможно патологични. Някои лаборатории използват са сравнение и данни от лица с клинични изяви, като при наличие на големи по размер CNVs, те се приемат за патологични, а за останалите дисбаланси в засегнатия индивид (които обикновено са по-малки по размер) се приема за по-малко вероятно да допринесат за етиологията на заболяването, което не означава, че комбинация от повече на брой варианти не би могла да е с патолоична природа[102]. В момента, голяма част от информацията в базата данни на геномните вариации се извлича от проекти използващи една платформа и / или технология, за идентифициране CNVs, и само една малка част от тях в крайна сметка се валидират. Следователно в каталогизирането са възможни грешки, което изисква повишено внимание при определянето на киничното знаение на вариациите в броя на копията, особено при такива диагностицирани при единични пациенти. Поради това преди да бъдат включени към дадена група съответните CNVs, се проучват много внимателно[103].

Към момента са налични бази данни съдържащи информация за CNVs, установени при пациенти с фенотипна изява. Това спомага за сравняване с откритите вече CNVs и категоризиране на нововъзникналите варианти. Достъпни бази данни предоставящи тези възможности са: DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources)[126], ECARUCA (European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations)[127], CNVProject (The Copy Number Variation (CNV) Project Data Index)[128], CAD (Chromosome Abnormality Database)[129], CAC (The Chromosome Anomaly Collection)[130], HSV Database (Human Structural Variation Database)[131], MCNdb (Mendelian Cytogenetics Network Online Database)[132].

- **Категоризиране на нововъзникнали CNVs с неясно клинично значение.**

В случай на липса на информация за нововъзникнали варианти в броя копия могат да се приложат накои критерии спомагащи за категоризирането им според:[102]

- **Съдържание на гени.**

Потенциалната клинична значимост на CNV се увеличава с нарастване на броя включени в региона гени, което е особено вярно, в случай че се съдържат OMIM гени важни за развитието и / или ако са дозозависими.

- **Същност на CNVs.**

Интерпретацията на дадени варианти в броя копия може да се окаже трудна поради липса на достатъчно подробни бази данни, въпреки непрекъснатото им разширяване. Необходими са задълбочени изследвания на много здрави контроли. Вариантите в броя копия могат да се срещат както като делеции така и като дупликации. Понастоящем се приема, че дупликациите са вид аберации, които се толерират повече от делециите, което означава че последните е по-вероятно да се окажат с патологична природа. Въпреки това у здрави индивиди са наблюдавани хетерозиготни делеции, което означава, че у клинично здрав индивид тя може да се категоризира като нормална, докато при лице носител на рецесивна мутация, при делеция на здравия вариант на гена, може да бъде определена като патологична. Интерпретацията на CNVs, се затруднява допълнително и от факта, че някои варианти могат да бъдат представени в популацията в делеционна и дупликационна форма. Някои изследователи установяват, че в човешкия геном има най-малко 740 Kb ДНК, представени само от едно копие както и наличие на хомозиготни делеции у здрави лица[77,123,133,134]. Истановено е също, че малки и средни по размер делеции се срещат по-често при здрави индивиди, докато по-големите са характерни за пациенти с генетчни болести.

- **Размер на CNVs.**

Има голяма вероятност големите по размер CNVs да съдържат повече дозо-зависими гени, въпреки, че са установени и нормални такива[77,135.]

- **Механизми на възникване на вариациите в броя копия**

Приблизително 20-40% от нормалните полиморфни CNVs, както и много де ново възникнали варианти, свързани със съответен фенотип имат повтарящи се точки на прекъсване[77,136-140], намиращи се в региони които съдържат големи сегментни дупликации. Тези варианти включват все по-голям брой рекурентни CNVs свързани с клиничен фенотип. Такива са идентифицираните в следните райони: 16p11.2 и 17q11.2 при пациенти с неврологични заболявания, включително и тежка ИН, аутизъм и шизофрения[141-144]. Не-рекурентните CNVs имат различни размери, но се припокриват по локализация. По-голямата част от нормалните CNVs и голям процент от патологичните попадат в тази категория[140]. Повечето не-рекурентни CNVs представляват делеции или тандемни дупликации. Същевременно се наблюдават и по-сложни пренареждания включващи нормални последователности или инверсии и могат

да съдържат едновременно делетиран и дуплициран материал в рамките на един и същи регион. Някои от тези CNVs са изключително сложни, с десетки изменения, струпани в един геномен регион[145], подобно на феномена наречен „chromothripsis" наскоро описан в ракови клетки[146]. Chromothripsis е явление, при което в рамките на едно събитие локализирано в определена геномна област се появяват до хиляди хромозомни аберации в една или няколко хромозоми и е известно, че участват в появата на ракови клетки и вродени заболявания. Тази масивна аберация се случва по време на едно едонствено катастрофално събитие в историята на клетката. Клетки, които могат да оцелеят след подобно събитие са със силно мутирал геном, който може да придаде селективно предимство на клетката и да доведе до неоплазия[147]. Феноменът chromothripsis се противопоставя на конвенционалната теория, че ракът възниква след постепенното придобиване на геномни аберации и соматични мутации[148].

Най-общо механизмите за възникване на варианти в броя на копията са три: не-алелна хомоложна рекомбинация (NAHR - **N**on<u>a</u>llelic **H**omologous **R**ecombination), не-хомоложно лигиране на терминални участъци (NHEJ - **N**on-**H**omologous **E**nd-**J**oining) и инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата (FoSTeS - <u>Fo</u>rk <u>S</u>talling And <u>Te</u>mplate <u>S</u>witching)[149].

- **Не-алелната хомоложна рекомбинация** (Nahr) е форма на хомоложна рекомбинация, която се случва между две секвенции с повече от 95% хомоложност, като последователностите не са алели. Това обикновено се случва между секвенции с ниски повторения на копиране (LCRs - Low Copy Repeats). Тези елементи обикновено варират от 10-300 Kb и се наричат още сегментни дупликации. Богати са на гени, псевдогени и регулаторни елементи и вероятно са от еволюционно значение. Сегментните дупликации се срещат най-често в субтеломерните райони[150.] Поради високата им хомоложност на тези места, по време на мейозата може да възникне неалелни хомоложна рекомбинация, което да доведе до възникване на аберации свързани с редки генетични болести.

Примери за това включват неврофиброматоза тип 1 микроделеционен синдром (NF1), 17q21.3 микроделеционен синдром (Koolen De Vries syndrome), характеризиращ се с изоставане в психомоторното развитие, епилепсия, сърдечни дефекти, бъбречни аномалии и др., 3q29 микроделеционен синдром, включващ ИН, дисморфични белези, аутизъм, атаксия и др.[151,152,153].

- **Не-хомоложно лигиране на терминални участъци**

Терминът Non-homologous end joining (NHEJ) е въведен през 1996 г. от Moore и Haber[154] и е един от механизмите за поправка на двойноверижните нарушения на ДНК. При този механизъм след детекцията на повредите, следва отместване на краищата, преобразуването им в комплементарни (чрез изрязване или добавяне на нуклеотиди) с последващо лигиране. Това крие риск от загуба на генетичен материал например скъсяване на теломерните участъци или нарушаване на техните функции с последващо формиране на ракови клетки[155].

Към този механизъм спада и алтернативното не-хомоложно лигиране на терминални участъци (Alt-NHEJ). Това което го отличава от останалите е използването на 5-25 базова двойка при поправка на двойноверижните нарушения[156]. Механизмът често се свързва с хромозомни аномалии като делеции, транслокации, инверсии и други сложни преустройства, тъй като не се извършва проверка за комплементарност. Механизмът често води до грешки и до риск от онкогенеза.

- **Инактивиране на репликационната вилка с превключване на матрицата - fork stalling and template switching (FoSTeS)**

Това е друг механизъм за възникване на варианти в броя на копията в генома и би могъл да обясни сложните геномни преустройства, свързани с процеси на демиелинизация на ЦНС[149]. В основата на механизма стои инактивиране на активната по време на ДНК репликацията вилка близо до LCRs региони или ДНК лезии. След дисоцииране на изозтаващата верига от водещата, поради сходни ДНК последователности може да бъде включена друга репликационна вилка, водеща до нов ДНК-синтез, което може да генерира съединяване на ДНК последователности от различни региони. Молекулярните детайли на механизмът могат да се обяснят с microhomology-mediated break-induced replication (MMBIR) модел, разгледан подробно в някои източници[157]. Някои изследователи предостават доказателства, че геномни пренареждания, вариращи по размер от няколко мегабази до няколкостотин базови двойки могат да бъдат генерирани от този механизъм. Аберациите възникнали в резултат на FoSTeS / MMBIR механизмът могат да възникнат митотично и да доведат до поява на дупликации, трипликации дублиране или до пренареждане в отделни екзони, което би могло да се окаже от голямо значение за еволюционните процеси[158]. Предполага се, че този механизъм е свързан със Pelizaeus - Merzbacher синдрома, който се характеризира с забавено психомоторно развитие, влошена координация и ИН. Изследването е осъществено посредством използване на сравнителна геномна хибридизация (aCGH) за проучване на нерекурентни *PLP1* дупликации в X

хромозомата причиняващи Pelizaeus-Merzbacher болестта[149]. Интересното е, че подобно на региона *PLP1*, са открити също SMS / PTLS (Потоцки-Лупски синдром, нарачен още 17p11.2 дупликационен синдром) и *MECP2* свързан със синдром на Рет, (MECP2 дупликационен синдром). Това са региони със сложна геномна архитектура и множество LCRs участъци[159-161].

Вариантите в броя на копията могат да повлияят фенотипната изява по няколко различни механизма. Промените в броя копия могат да засегнат дозо-завизими гени, участващи в прицеси в които е от съществено значени количеството синтезиран протеин. Пример за това е болестта на Шарко-Мари-Тут тип 1. Друг механизъм за повлияване е позиционния ефект, при който гените могат да се окажат отдалечени от регулаторните си елементи и това да промени експресията им. Подобен ефект е подозиран при Уилямс-Бойрън синдром[162]. Други варианти са директното разрушаване на гени, фузия на гени или загуба на хетерозиготност с проява на рецесивна мутация[74]. Въпреки направените до момента проучвания, са необходими подробни допълнителни изследвания в областта с високо резолютивни технологии за да бъдат открити нови генотип-фенотипни корелации, да бъде подобрена диагностиката и да бъдат обогатени данните за човешката еволюция. От изложеното по-горе става ясно колко важни са генетичните фактори по отношение на появата на палитра от вродени аномалии и колко допълнителни изследвания са необходими за изясняването им.

3.5.2 Етиологични фактори на средата водещи до поява на вродени аномалии.

Към тях спадат тератогенните фактори с пряко въздействие върху развитието на индивида, които могат да бъдат свързани и с влиянието на социално-икономически и демографски фактори (СЗО 2016г.). Бедността и лошите условия на живот са косвен фактор в етиологията на ВА. По данни на СЗО около 94% от тежките вродени аномалии възникват в страни с ниски и средни доходи, което е свързано с малнутриция на бременните жени, повишена експозиция на вредни въздействия (инфекции, алкохол), по-ниска здравна култура и контрол над провеждането на скринингови програми.

Тератогенните фактори се изучават от науката тератология и са свързани с аномалии на физиологичното развитие. Често се свързва с вродените дефекти при човека, но в действителност изучава и други форми на живот като например растенията, както и постнатални етапи от развитието на индивида включително

пубертета. Тератогенното въздействие може да се изяви с богата клинична картина най-общо включваща вродени дефекти, ИН, забавяне на разстежа, различни структурни малформации и др.[163]. Натрупването на данни за вътреутробното развитие и уязвимостта на развиващия се ембрион и фетус доведе до усъвършенстването на шестте принципа на Тератологията, които се прилагат и до днес. Тези принципи са описани от Джим Уилсън през 1959 г. и в монографията му „Околна среда и вродени дефекти"[164]. Принципите са следните:

1. Чувствителността на ембриона на тератогенно въздействие зависи от неговия генотип и взаимодействието му с околната среда.
2. Чувствителността на ембриона на тератогенно въздействие варира в зависимост от етапа на развитието, по време на който се осъществява неблагоприятното влияние. Има критични периоди свързани с чувствителността на различните органи и системи към тератогените.
3. Тератогенните агенти действат по специфичен начин на развитие на клетките и тъканите и водят до събития причиняващи аномалии в развитието.
4. Ефектът на неблагоприятните въздействия върху развиващите се тъкани зависи от естеството на въздействието, като факторите са няколко; вида на тератогена, пътят за навлизане в майчиният организъм, дозата на експозиция, скоростта на преминаване през плацентата и системната абсорбция и генотипа на майката и плода. Като допълнение е важен и техният метаболизъм.
5. Има четири прояви на отклонения в развитието - смърт, малформации, забавяне на растежа и функционални дефекти).
6. Отклоненията в развитието нарастват по честота и степен на проява при покачване на дозата на експозиция – от липса на ефект до 100% смъртност (LD100) доза.

В изследванията на тератогенния потенциал на факторите на околната среда се използват животински модел (например, плъхове, мишки, зайци, кучета и маймуни). Ранните проучвания са провеждани върху бременни животни, с цел изучаване на скелетните и висцерални аномалии. Въпреки, че това все още е част от процедурите за тератогенна оценка днес, тератологията се насочва към молекулярно ниво, като се стреми да прецизира механизмите на действие на увреждащите агенти. За тази цел обикновено се използват генно модифицирани мишки. Тези изследвания предоставят информация за възможните рискове от приема на даден медикамент или други тератогени, а изучаването на механизмите на въздействие не само би могло да

предотврати появата на аномалии, но и да помогне за нови терапевтични техники, безопасни при бременни жени.

Смята се, че около 10-15% от вродени структурни аномалии са резултат от неблагоприятното въздействие на факторите на околната среда върху пренаталното развитие[165]. Това означава, че приблизително 1 на 250 новородени имат структурни дефекти, причинени от излагане на фактори на средата, а вероятно броят на деца с забавяне на растежа или функционални нарушения е още по-голям.

През първите 2 седмици от развитието на ембриона се смята, че организмът реагира на принципа „всичко или нищо", ембрионът оцелява без изменения или загива. През ембрионалния период протича органогенезата характеризираща се с усилено делене и диференциране на клетките в тъкани, поради което тогава възникват и най-тежките ВА. През феталния период голяма част от органогенезата е приключила и следва нарастването на органите. През този етап се смята, че фетусът е по-малко уязвим, поради което най-често срещаните аномалии, свързани с тератогенна експозиция са интраутеринно изоставане на растежа, леки грешки на морфогенезата, деформации и дисрупции. Известно е, че тератогените причиняват аномалии независимо от периода в който действат или локализацията им, както и че стават все повече. Примери за тератогенни агенти са следните:

3.5.2.1 Радиация

Йонизиращото лъчение може да увреди развитието на ембриона, причинявайки клетъчна смърт или хромозомни аномалии. Критичният период за експозиция на лъчение е 8-15 седмица след оплождането[166,167]. Към момента не е известна максималната безопастна доза за човека, но е препоръчително бременните жени да не получават обща доза лъччение по-висока от 0.5 рентнега в рамките на цялата бременност.

3.5.2.2 Инфекциозни агенти

Тератогеният ефект на инфекциите може да се изразява в инхибиране на митотично делене, в директен цитотоксични ефект или съдова патология на ембриона или плода. Същевременно опитите за справяне с възникналия процес може да доведат до образуване на цикатрикси или калцифициране, което допълнително уврежда тъканите[168,169]. Инфекциозни агенти, които не водят до поява на вродени аномалии, но са летални за ембриона и плода са ентеровируси (коксаки вирус, полиовирус и еховирус), хепатит и др.[170,171]. Други примери за инфекции с тератогенен ефект са:

- **Рубеола** - причиняваща рубеолна ембрио- или фетопатия, описано в раздел класификация.
- **Варицела** – причинена от варицела зостер вирус, като поради разпространението на заболяването в детеродна възраст от 85 до 95% от жените имат изграден имунитет. При развитие на варицела по време на протичането на първите 20 гестационни седмици (гс) от бременността, се наблюдава 2% риск от развитие на синдром на вродената варицела, който включва белези, вродени дефекти на мускулите и костите, деформации на крайниците, микроцефалия, слепота, гърчове, и ИН. Този синдром е рядък след този период от вътрутробното развитие[172]. Ако контактът е около раждането между 25 и 50% от новородените са в риск и около 30% загиват без терапия.
- **Вирусен паротид** – при позитивен тест при новородени, за този причинител е наблюдавана ендокардна фиброеластоза[173]. Причинно-следствената връзка все още не е доказана.
- **Парвовирус** – човешкия парвовирус В-19 е в състояние да преминава трансплацентарно при симптомно или безсимптомно протичане на инфекцията при бременни. Свързана е с по-висока от средната загуба на плода и може да доведе до спонтанен аборт в първия триместър, хидропс феталис през второто тримесечие, и мъртво раждане[174,175]. Наблюдават се генерализиран миокардит, миозит на скелетните мускули и очни аномалии[176]. Човешкият парвовирус В-19 има афинитет към еритропоетичната тъкан и е свързан с развитие на фетална анемия водеща до сърдечна недостатъчност.
- **Сифилис** – има данни за развитие на сифилитичен ендометрит водещ до аборт през първия триместър, въпреки, че се смята за невъзможно преминаването на спирохетите поради непропускливост на цитотрофобластните клетки на плацентата, като този слой изчезва през шестия месец. При нелекувана инфекция в първичен или вторичен стадии, 50% са мъртвородени или умират в рамките на 4 седмици след раждането. При нелекуван майчин сифилис в третичен стадий, 20% до 60% от децата са нормални, 40% имат вроден сифилис, 20% са родени преждевременно, а 16% са мъртвородени или умират в рамките на 4 седмици след раждането. При нелекуван сифилис в късният етап на третичния стадий, 75% от бебетата не са засегнати, 10% имат вроден сифилис, 9% са родени преждевременно, 10% са мъртвородени, и 1% умират в рамките на 4 седмици след раждането[177]. Развива се хепато-спленомегалия, анемия, жълтеница, обриви, слепота, глухота и др.

- **Токсоплазмоза** - Инфекцията се разпространява през плацентата. Малформациите сса по-рядко срещани, като по-чест симптом е хидроцефалия и микроцефалия резултат от менингоенцефалит. Възможно е и развитие на хориоретинит прогресращ до загуба на зрението. Хидроцефалия и церебрални калцификати, хепатит, и лимфаденопатия са най-честите усложнения при кърмачета с пренатално заразяване[178].

- **Зика вирус** - представлява флавивирус предаван на хората от комари от рода Aedes aegypti. Документирано е предаване от майката на плода перинатално, по полов път; чрез кръвопреливане и лабораторна експозиция. Повечето Зика вирусни инфекции са асимптоматични. При поява на клиника се наблюдават остро начало на треската, макулопапулозен обрив, болки в ставите, или непурулентен конюнктивит. По време на бременност Зика вирусната инфекция може да доведе до неблагоприятни последствия, като например загуба на плода, и микроцефалия и други сериозни мозъчни аномалии. Синдромът на Гилен-Баре - рядко автоимунно заболяване, засягащо периферната нервна система, също се свързва с Зика вирусната инфекция[179].

- **Други вирусни инфекции -** Полиовирусът е свързан с аборт, преждевременно раждане и менингомиелит[180], еховирусът - с дисеминирана виремия[181], вирусът на хепатит - с неонатален хепатит[181].

3.5.2.3 Термодисрупции

- **Хипертермия – това е** състояние на експозиция на температура от порядъка на поне 38,9°C, между 4-та и 14-та седмица от бременността, оказващо влияние върху процесите на митоза[182,184]. Наблюдавана е тежка ИН, гърчове, микрофталмия, лицев дисморфизъм и др.[185]. При проучване на деца изложени на майчина хипертермия от 7 до 16 седмица на бременността, се наблюдава хипотония, артрогрипоза или дисгенезия на ЦНС, включително аненцефакия[186] и енцефалоцеле[187].

- **Хипотермия –** възниква при температура на тялото под 35°C. Наблюдавани са множество вродени дефекти[188].

3.5.2.4 Токсични метали

- **Олово Pb** – при експозиция на олово, повече от 90% от него остава акумулирано в костите и може да бъде освободено в кръвния ток, афектирайки плода години по-късно. Нива на Pb ≥10 мкг / дл се считат за повишени, но не животозастрашаващи. Терминът "оловно отравяне" се отнася до нива ≥50 мкг / дл. Неблагоприятните ефекти включват спонтанен аборт и преждевременно раждане, също така малки малформации,

хемангиоми, линфангиоми, хидроцеле, кожни проблеми, крипторхизъм[189-192]. VACTERL асоциацията също е наблюдавана[193].

- **Живак Hg** - Органичните форми на живак са значително по-токсични от неорганичните. Метилживакът, най-токсичната органична форма, може да причини тежки мозъчни увреждания. Ранните ефекти на отравяне с живак се проявяват при нива над 3 мкг / дл[194]. Наблюдавана е атрофия на малкия мозък и спонгиоформена малация в зрителната кора и други корови области[195] и полиневрит.

- **Литий –** използва се най-вече при лечение на афективни разстройства, като при преминаване в плода и установени литиеви концентрации > 0.64 ммол / л, се наблюдават значително по-ниски стойности на адаптация по Апгар. Високите концентрации са свързани с перинатални усложнения, сърдечно-съдови малформации, по-специално Ebstein аномалия и трикуспидална атрезия[196-199]. Наблюдавана е преходна летаргия, хипотония, цианоза, лошо хранене и дихателни проблеми[196]. Други дефекти, които са били забелязани при кърмачета, изложени на литий интраутеринно включват аномалии на ЦНС, ухо, уретер и щитовидната жлеза[200].

3.5.2.5 Експозиция на химикали

- **Полихлоридни и полибромидни бифеноли** – използват се като изолационни течности, топлообменници, пластификатори и химически добавки и са известни като замърсители в световен мащаб. Наблюдава се пергаментен вид на кожата, десквамация и тъмна пигментация ("кока-кола бебе"), тъмно оцветени нокти, конюнктивит, ниско тегло, екзофталм, хопотрофия, микроцефалия, хипотония и хипорефлексия.

- **Толуен –** ембриопатията причинена от толуен включва пренатално и постнатално изоставане в растежа, микроцефалия, аненцефалия, забавяне на развитието, сърдечни и дефекти на крайниците и краниофациални аномалии, подобни на фетален алкохолен синдром (FAS)[201-203]

3.5.2.6 Майчина патология

- **Затлъстяване** - свързано е с неблагоприятни последици, включващи макросомия, хипертония, преeклампсия, гестационен захарен диабет и смърт на плода[204,205]. В допълнение е установен повишен риск от вродени дефекти.

- **Захарен диабет –** Хипергликемията оказва влияние върху ембригенезата и е установено, че може да доведе до забавяне на растежа, краниални аномалии, дефекти на невралната тръба (ДНТ), вродени сърдечни дефекти и др. Предполага се, възможна роля на свободните кислородни радикали образувани в условия на стрес и диабетна

тератогенеза. Патогенезата на диабетната ембриопатия е хетерогенна[206,207] и поддържането на глюкозната хомеостаза е от съществено значение за предотвратяването й. Установена е и връзка между нивата на HbA1c, свързващ глюкоза и честотата на големи вродени аномалии при новородени на майки с диабет[208,209]. При нива на HbA1c по време на бременността, надхвърлящи 11,5%, в 66% от новородените са наблюдавани вродени аномалии, включващи сърдечни дефекти, аномалии на ЦНС, бъбреци и скелет. Чести са съдовите аномалии, декстропозиция на сърцето, както и аненцефалия, спина бифида и хидроцефалия.

- **Хипо- и хипертироидизъм -** неонатален хипотиреоидизъм се развива при преминаване в плода на антитироидни медикаменти или при образуване на антитела от майката. Наблюдавани са глухота, ИН и др. При хипертироидизъм се проявяват транзиторни симптоми като, екзофталм, безпокойство, тахикардия, периорбитален оток, вълчи апетит, хипертермия, кардиомегалия, сърдечна недостатъчност и хепатоспленомегалия.
- **Хипопаратироидизъм** – включва деминерализация на костите и субпериостална реабсорбция на костно вещество в дългите кости, интраутеринно забавяне на растежа, стеноза на белодробната артерия, вентрикуларен септален дефект и мускулна хипотония.
- **Недостиг на йод** – при недостиг на йод при майката по време на бременността са наблюдавани умствена изостаналост, спастична диплегия, глухота, и страбизъм у новороденото[210,211].
- **Майчина фенилкетонурия** – при нива на фенилаланин над 20 мг / мл у майката, 92% от новородените са с умствена изостаналост; 73% - с микроцефалия; 40% имат интраутеринноизоставане в разстежа, и 12% - сърдечни малформации. Една четвърт от бременностите завършват със спонтанен аборт.

3.5.2.7 Алкохол, тютюнопушене и някои медикаменти

- **Фетален алкохолен синдром (ФАС) –** понастоящем се смята, че няма безопасно количество алкохол приеман по време на бременност, поради наличието на полиморфизми свързани с ензимите алкохолдехидрогеназа и ацеталдехид дехидрогеназа, които допринасят за различна чувствителност на фетуса към алкохол. Известна е ролята на ацеталдехида като инхибитор на синтезата на ДНК, аминокиселинния транспорт и развитието на мозъка[212,213]. Пациентите с ФАС имат три

основни характеристики: пренатално и постнатално забавяне в растежа, лицеф дисморфизъм и дисфункция на ЦНС.

- **Тютюнопушене -** Никотинът е вазоконстриктор, водещ до ограничаване на кръвоснабдяването на матката. Наблюдава се интраутеринно изоставане в растежа, поради намалена перфузия на тъканите[214]. Пушенето на цигари по време на бременност повишава риска от перинатална смъртност и заболеваемост[215]. Срещат се отлепване на плацентата, плацента превиа, спонтанни аборти, преждевременно раждане и др.[216].

- **Употреба на марихуана -** Активната съставка на марихуаната е 8,9-тетрахидроканабинол, мастноразтворим, лесно преминава през плацентата и може да се задържи в кръвообращението на плода дълго време[217,218]. Описани са забавяне на растежа и малформации особено при употреба през първия триместър.

- **Диетиламид на лизергиновата киселина (LSD) -** при децата, родени от майки, използвали LSD преди или по време на бременност са установени различни аномалии. Наблюдавани са дефекти на крайниците, очите, ЦНС, артрогрипоза и др.[219].

- **Кокаин –** поради блокиране на обратното захващане на невротрансмитерите се стига до повишени нива на норепинефрин и допамин, което може да промени бионаличността и усвояването на калций и да намали притока на кръв от матката към плацентата. Наблюдават се отлепване на плацентата, микроцефалия, мозъчни кръвоизливи, интраутеринно изоставане на растежа, дефекти на крайниците, атрезия на червата и некротизиращ ентероколит [220]. Увеличава се честотата на преждевременно раждане, и внезапната детска смърт [221].

- **Седативи –** при експозиция на фенобарбитал са наблюдавани увеличена честота на цепки на устната и небцето и вродени сърдечни заболявания. Бензодиазепин-съдържащите медикаменти при редовна употреба и в по-високи дози водят до интраутеринно изоставане в растежа, цепки на устната и небцето, лицев дисморфизъм, въпреки, че някои изследвания не показват значими отклонения от нормата на детското развитие.

- **Изотретиноин (ретиноева киселина)** - Рискът от фетални аномалии при прием на изотретиноин от бременни жени е 25%[222]. Критичният период на експозиция е от 4-та до 10-та седмица от бременността. Дефектите включват хидроцефалия, микроцефалия, церебеларна дисгенезия, плосък корен на носа, ушни дефекти, цепки на небцето, аномалии на аортата, сърдечни дефекти, хипоплазия на кората на надбъбречните жлези[223,224]. Наблюдават се и спонтанни аборти.

- **Талидомид –** използван е клинично през 1960г. Описани са дефекти на крайниците, амелия, хемангиоми на лицето и хранопровода, атрезия на дванадесетопръстника, сърдечни дефекти, бъбречна агенезия, аномалии на пикочните пътища, генитални дефекти, зъбни аномалии, аномалии на ухото, парализа на лицевия нерв, офталмоплегия, анофталмия, микрофталм, и колобома.
- **Дефицит на фолиева киселина или фолиеви антагонисти** - Недостигът на фолиева киселина се наблюдава при голям процент от жените, с деца с дефект на невралната тръба (ДНТ) и аненцефалия. Подобен е ефектът и на антагонистите на фолиевата киселина Недостигът на този витамин изглежда води до 70% от случаите с ДНТ[225].
- **Антиконвулсанти** – водят до развитие на фетален антиконвулсантен синдром. Приемът на валпроева киселна увеличава риска от ДНТ, сърдечни аномалии и др.
- **Варфарин** – при дългосрочна антикоагулантна терапия са наблюдавани атрезия на хоаните, аномалии на крайниците, микроофталмия, атрофия на зрителният нерв, Мозъчни аномалии включват микроцефалия, атрофия на зрителния нерв, гърчове, хипотония и ИН[226].
- **Инхибитори на ангиотензин конвертиращ ензим и статини** – при употреба на първите е съобщено за спонтанни аборти, пренатална и неонатална смъртност, неонатален респираторен дистрес, дефекти на ЦНС и крайниците, отворен дуктус артериозус, олигохидрамнион, тубулна дисплазия и др.[227.] При употреба на статини са наблюдавани дефекти на развитието и асоциация с някои синдроми.

Натрупани са данни за още много вещества с тератогенен ефект, но те са предмет на тератологията, поради което няма да бъдат обсъждани в дисертационния труд.

3.5.3 Мултифакторна етиология на вродените аномалии

Франсис Галтън избира многофакторното унаследяване като отправна точка за своите изследвания, а аналитичните му методи са издържали изпитанието на времето. Той използва подробни семейни данни за изучаване на сложното унаследяване на определени черти между родителите и потомството и между идентични и неидентични близнаци, за да усъвършенства анализа и да се разработят нови статистически методи, с цел измерване степента на унаследяване. Поради всички тези причини, той може да се смята за създател и на количествената генетика.

Многофакторните аномалии възникват от комбинираното действие на генетични фактори (комбинация от гени от двамата родители) и фактори на средата. При този тип

аномалии е налице предразположение към тях свързано с действието на много гени (полигенен комплекс) с малък ефект, в комбинация с фактори на околната среда. Рекурентният риск е променлив и се изчислява в зависимост от степента на родство, популационната честота, тежестта на клиниката, броя на родените деца с патология. При някои мултифакторни аномалии с по-голяма тежест по отношение на появата на патология са генетичните фактори, а тези на средата са с ограничена роля. При други е обратното и това определя някои от характеристиските на заболяването. Примери за такива аномалии са цепки на устата и небцето, ДНТ, вродени сърдечни малформации, вродена луксация на тазобедрена става, пилорна стеноза, неоплазии и др.

3.5.4 Идиопатични аномалии

Голяма част от вродените аномалии, около 50% са все още с неясна етиология или представляват състояния, причините от недостатъчно проучени фактори. За да бъдат причислени към тази група аномалиите не трябва да се дължат на хромозомни аберации или да следват традиционен тип на унаследяване. Клиничната картина при тези вродени дефекти е разнообразна и налага добра диференциална диагноза. Примери за неизяснени аномалии и синдроми са следните:

- **Аномалии на ушната мида** – има няколко степени на развитие, като се започне от малки израстъци до полиотия[228]. Това е относително честа вродена аномалия на първата и втората хрилна арка. Причината не е изясненя, като в някои случаи могат да присъстват едновременно и други аномалии, включително цепки на небцето и устната, или мандибуларна хипоплазия. Налице е известна връзка със синдрома на Голеденхар (около-аурикуло-вертебрален синдром)[229] и със синдром на Вилдерванк.
- **Енцефалоцеле –** представлява дефект на невралната тръба, който се характеризира с незатваряне на предните части на невралната тръба, по време на ембрионалното развитие. Наблюдава се костен дефект, който води до поява на пространство, през което част от мозъка излиза извън черепа. Енцефалоцелето може да бъде разположено между челото и носа или на задната страна на черепа. Тежестта на клиниката варира в зависимост от местоположението му.

Въпреки че точната причина не е известна, този дефект се свързва с различни тератогени и дефицит на фолиева киселина.

- **Вродена хипертрофия на страничната сгъвка на палеца** – това е рядко кожно заболяване с неизвестен етиология. Описано е за първи път от Мартинет и др. през 1984 г. Това понякога болезнено състояние включва свръхрастеж на меките тъкани, като

може да се стигне до частично покриване на нокътна плочка. Състоянието може да претърпи спонтанно обратно развитие[230].

- **Вродени дермоидни кисти** – представляват тератоми с кистозна природата, съдържащи зрели и твърди тъкани. Често се състоят от кожа, космени фоликули, потните жлези, кичури дълга коса, себум, кръв, мазнини, кости, нокти, зъби, очи, хрущяли и щитовидната тъкан. Почти винаги са доброкачествени. Етиологията на състоянието не е напълно изяснена, въпреки наличието на няколко хипотези.
- **Синдром на Поланд** – това е рядка вродена аномалия, характеризираща се с недоразвитие или отсъствие на гръден мускул унилатерално, често съчетано със синдактилия от същата страна. Може да е в съчетание с други малформации, а етиологията е неизвестна.
- **PHACES синдром P**osterior fossa malformations–**h**emangiomas–**a**rterial anomalies–**c**ardiac defects–**e**ye abnormalities–**s**ternal cleft and supraumbilical raphe syndrome – характеризира се с: малформации на задната черепна ямка, хемангиоми, артериални аномалии, сърдечни дефекти, стернални дефекти, аномалии на очите, и супраумбиликален шев[230,231]. Най-разпространени са мозъчно-съдови и сърдечно-съдови аномалии[232]. Налични са много изследвания в областта, но към момента причината е неясна. Смята се че нарушенията при този синдром се дължат на грешки възникнали по време на ранното развитие.
- **Перикраниален синус** – представлява рядко заболяване, характеризиращо се с вродена, понякога придобита епикраниална венозна малформация. Представлява абнормна комуникация между интракраниални и екстракраниални венозни пътища[230].
- **Трето зърно** – допълнително зърно, което често се бърка с бенки, поради което реалната му честота е много по-висока, според някои данни се среща при 1 на 18 индивида[230,233]. Етиологията е неизвестна.
- **Синдром на Кабуки** - характеризира се с сърдечни пороци, аномалии на пикочните пътища, хипотония, рецидивиращи инфекции на ушите, изоставане в растежа. Наблюдават се още скелетни аномалии, халтави стави и др.[234]. Установени са стотици мутации водещи до поява на синдрома, причината все още не е напълно изяснена.

Посочените примери, макар и малка част от етиологично неизяснените състояния, показват нуждата от провеждане на задълбочени изследвания с високорезолютивни техники с цел изясняване на причините, за определяне за всеки един синдром, ролята

на генетичните фактори и факторите на средата и процентното им изражение, което ще помогне за предотвратяването на тези и много други състояния.

3.6 Диагностични подходи при вродените аномалии

Наследствените болести водят в голям процент от случаите до развитие на тежка клиника, инвалидизиране или са несъвместими с живота. Тежките вродени аномалии засягат не само пациентите, но и техните близки и обществото като цяло. Поставянето на точна диагноза е изключително важно за последващото лечение, изчисляването на рекурентния риск и за профилактика и превенция на заболяването в семейството и в популацията. С правилното диагностициране и откриване на нови синдроми и генотип-фенотипни корелации ще се даде възможност за развитие на бъдещи генетични терапевтичните подходи.

Съмнението за наличие на генетично заболяване може да възникне въз основа на физически характеристики, фамилната анамнеза на дадено лице или в резултат на положителен тест при провеждане на скрининг. Важно за поставяне на диагнозата е медико-генетичната консултация по време, на която се осъществява диагностична, прогностична и профилактична дейност. Индикации за провеждането и са: клинични признаци, предклинични признаци (хетерозиготни носители на автозомнорецесивна болест), репродуктивни неблагополучия, кръвнородствен брак, възрастов показател, злокачествени фамилни заболявания и тератогенеза по време на бременността. При първия етап от консултацията се определя точната диагноза, което се осъществява със снемане на подробен статус, назначаване на лабораторни и инструментални изследвания. Генетичната диагноза изисква събиране на подробна информация с цел построяване на родословно дърво, определяне на вида на заболяването (хромозомно, митохондриално, моногенно, полигенно). Необходими са различни специализирани генетични лабораторни техники. Вторият етап от консултацията определя риска за пациента, съобразено с всички особености на съответното унаследяване. Третият етап протича с предоставяне на заключение с препоръчителен характер. Генетичната диагностика използва много методи, между които са биохимични, цитогенетични, молекулярни, молекулярно-цитогенетични в зависимост от подозирания болестен

процес. В дисертационния труд ще бъдат разгледани по-подробно най-използваните методи за диагностика на нарушения в развитието.

3.6.1 Цитогенетичен анализ

Включва рутинен анализ на GTG оцветяване хромозоми, както и други цитогенетични техники. Развитието на цитогенетиката преминава през няколко фази, като началото се бележи с наблюдавания извършеи за първи път в растителни клетки през 1842 г. от ботаника Карл Вилхелм фон Негели. Поведение на хромозомите в животинските клетки е описано от Уолтър Флеминг, откривателят на митозата, през 1882г., а името е въведено от друг немски анатом, фон Валдейер през 1888 г. Следващият етап е свързан с развитието на генетиката в началото на 20 век, когато е установено, че хромозомите са носители на генетична информация[235,236]. Определянето на точният брой хромозоми в човешката клетка е отнело много години[237]. Следват разсъждения върху определянето на пола (1912 г. от Ханс фон Винивартер)[238] и броя на хромозомите - (1922 г – Пейнтер),[239,240]. Едва през 1956 год. Tjio и Levan установяват, че нормалната човешка клетка съдържа 46 хромозоми[241]. Благодарение на това откритие става възможно изследването на хромозомните дефекти и болести и се поставя начало на цитогенетиката. С разработването на квиникрин флуоресцентната техника за оцветяване (Q-ленти) и оцветяването по Гимза в края 1960 се разкриват уникални ивици за всяка двойка хромозоми, както и структурни аберации като транслокации, инверсии, делеции и дупликации. Понастоящем конвенционалния хромозомен анализ, в комбинация най-често с GTG оцветяване са рутинно използвани, като източник на хромозоми са най-често лимфоцити от периферна кръв. Въпреки широкото използване на този метод са налице и редица ограничения: ниска резолюция, отнема дълго време, трудоемък е, изисква квалифицирани умения и е труден за автоматизиране. За диагностичната стойност на метода са от значение качеството на получените метафази и резолюцията, като рутинно са налице около 400-500 ленти на хаплоиден набор и съответно 5-15 Mb резолюция. Като стандарт са приети 3 нива на резолюция – 400, 550, 850 ленти на хаплоиден набор. Под имерсионен обектив и увеличение от порядъка 1000-1200 пъти се анализират броят и формата, както и лентовите характеристики на хромозомите. Обикновено се кариотипират 12-15 пластинки, а при подозиране на мозаицизъм може да се стигне до анализиране на 100. Прилагането на цитогенетичните техники доведе до ракриване на много хромозомни аберации: През 1862 г., английският лекар Джон Лангдън Даун първи описва синдром

на Даун като отделен вид умствено изоставане, а през 1959 г. Lejeune[241] разкрива допълнително копие на хромозома 21. Тризомия 13 се наблюдава за първи път от Томас Бартолин през 1657, но хромозомната генеза е установена от д-р Клаус Патау през 1960 г.[242], поради което синдромът носи неговото име. Тризомия 18 е описана за първи път 1960 г. от Джон Хилтън Едуардс и синдромът носи неговото име[243.]

Други бройни аномалии, включват половите хромозомни. Синдром на Търнър, кръстен на Хенри Търнър, ендокринолог от Илинойс, който го описва през 1938 г. Първият публикуван доклад на жена с 45X кариотип е през 1959 г. от д-р Чарлз Форд и колеги[244]. XXY- синдромът на Клайнфелтър е кръстен на Хари Клайнфелтер и е описан през 1942, докладван 1959г.[245]. Срещат се и други аберации на половите хромозоми включително XXX, XYY, и XXXX. Цитогенетиката даде възможност за лесно диагностициране на тези аномалии свързани с множество малформации и често с ИН.

Следващите години и най-вече 80-те години на миналия век се развиват молекулярно-генетичните технологии, даващи възможност за детекция на ДНК последователности и откриване на причините за много моногенни заболявания.

3.6.2 Молекуларно-генетични методи

Тези методи се използват за диагностициране на генни мутации водещи до развитие на моногенни заболявания и генетични полиморфизми асоциирани с различни болести. Основните молекулярно-генетични методи за диагностика на моногенни дефекти се основават на полимеразна верижна реакция (PCR).

- **PCR** методът е открит от Кари Мулис и се състои от няколко стъпки, в резултат на които броят на използваните в началото ДНК молекули се увеличава, което е от съществено значение при липса на достатъчно ДНК материал за анализ. Тази реакция има много приложения: клинични, свързани с пренатална диагностика, онкогенетика, трансплантации; приложение при изследване на инфекциозни болести - ХИВ, туберкулоза и др; приложение в криминалистиката, в изследователската дейност и като основа за провеждането на други методи.
- **Секвениране** – Метод е изобретен от Фредерик Сангер и се извършва с помощта на дидезоксинуклеотиди белязани радиоактивно, докато по-новите технологии използват флуоресцентна боя.

Други методи са конформационен полиморфизъм на единични ДНК вериги (SSCP-Single strand conformation polymorphism, денатурираща гел градиентна електрофореза, полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти, алел специфичен PCR.

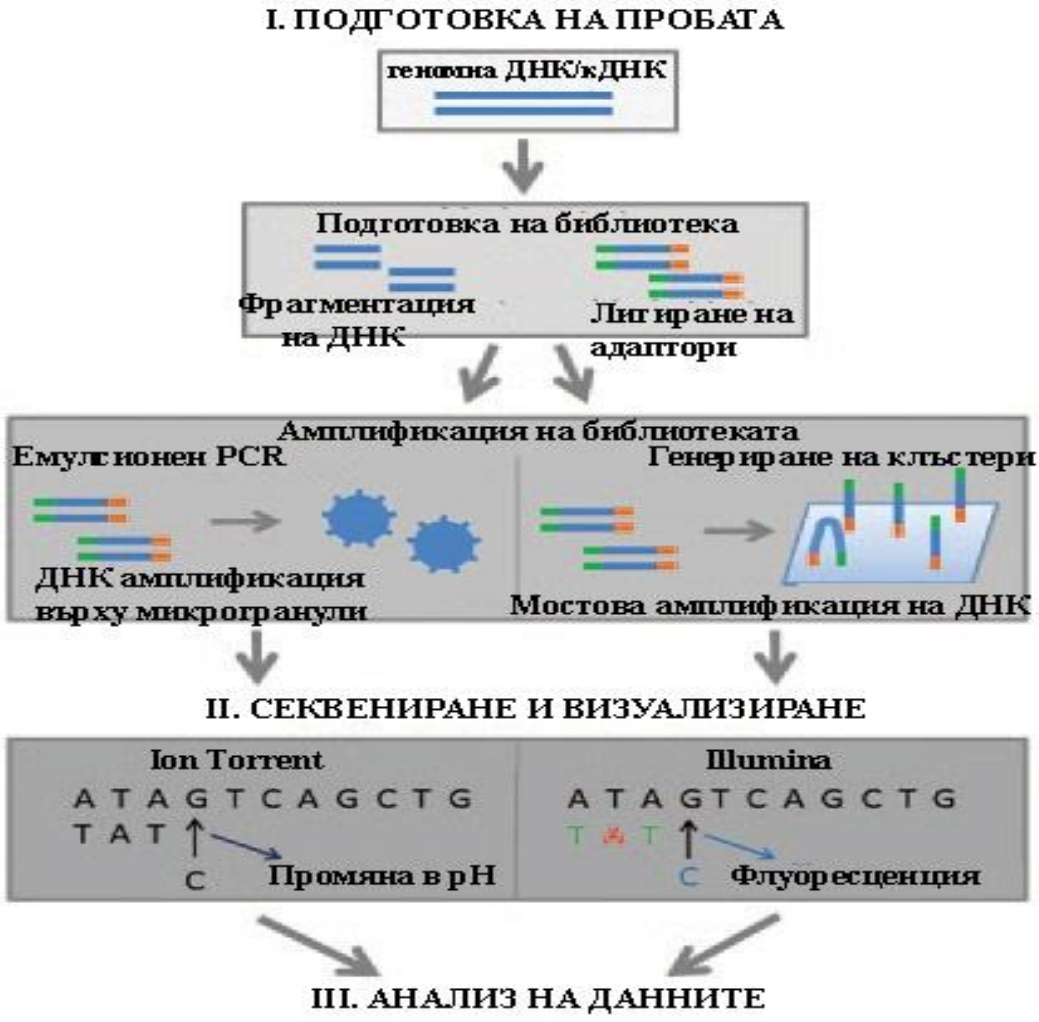
- **Секвениране от следващо поколение**

Научно-изследователските възможности в областта на генетиката се увеличиха извънредно много след разработването на секвенирането от ново поколение (NGS – next generation sequencing). Скринирането на целия геном в една реакция при неограничена резолюция практически дава възможност за откриване на огромен брой генетични варианти. Преди няколко години България беше сред първите пет страни в Европа след Англия, Германия, Швейцария и Холандия, която въведе секвенирането от ново поколение. С въвеждането на тази нова геномна технология у нас стана възможно да се направи трансфер на върхови научни постижения в клиничната практика.

Появата на секвенирането от ново поколение съществено промени пейзажа на геномната медицина, превъзхождайки класическото секвениране по много показатели – бързина (в една реакция могат да се изследват целия геном, екзом или панел от голям брой гени); точност на резултата; скрининг на генома без необходимост от предварителна информация относно суспектната генетична аномалия; ниска цена на анализа. Трябва да бъдат споменати и някои ограничения на технологията: неточно секвениране на повторени ДНК секвенции (несигурен резултат при динамични мутации); грешки при секвенирането на къси фрагменти (средно 200-500 нуклеотида); сложност на анализа на данните (необходимост от задълбочени познания в областта на биоинформатиката) [246-249.]

Ресеквенирането на генома чрез NGS намира голямо приложение в области като: **геномната медицина** - идентификация на нови гени и регулаторни елементи, участващи в патологичните процеси; подобряване на диагнозата и профилактиката на болестите; **фармакогеномиката** - дизайн на лекарствата въз основа на структурата на гените; изследване на ДНК мутации, асоциирани с предразположеност към заболяване или чувствителност към лекарства; **еволюцията и сравнителната биология** - сравняване на ДНК между различни организми може да разкрие историята на тяхната еволюция; **публичното здравеопазване и епидемиология** – секвенирането на генома на редица бактерии и вируси улесни идентификацията на нови вирулентни фактори и т.н [249]

NGS предлага три главни типа анализи – анализ на таргетни панели от гени, екзомно секвениране и цялостно геномно секвениране. Понастоящем по-малко от 10% от човешкия геном е характеризиран добре и ползата от секвенирането на целия геном на пациент би имало твърде ограничена полза при търсенето на генотип/фенотипни корелации. Следователно много по-подходящо за целите на медицинските проучвания би било секвенирането само на екзома (2% от генома, представляват протеин-кодиращи региони или екзони), менделианома (кодиращите региони на 2993-те известни до момента болестни гени) или използването на таргетни панели от гени за определени заболявания[250,251]. Технологията на NGS обхваща 3 главни стъпки: (1) подготовка на пробата; (2) секвениране и визуализация и (3) анализ на данните показани на фигура 5.



Фигура 5: Принцип на NGS технологията, включваща 3 главни стъпки: подготовка на пробата; секвениране и анализ на данните.

- **MLPA (мултиплексна лигазно-зависима реакция на амплификация на пробата)** – методът позволява да се отчетат промени в броя копия едновременно в до

45 различни ДНК-секвенции. Могат да се анализират до 96 проби едновременно, а резултатите са достъпни до 24 часа. Основава се на PCR-реакцията и включва 5 основни стъпки: денатурация на ДНК с хибридизиране към MLPA пробите , лигиране, PCR реакция, разделане на амплификационните продукти с електрофореза и анализ на получените резултати. MLPA е бърз и чувствителен метод но има и редица недостатъци: неспособност за детекция на нови мутации, сложен дизайн на проби; лесно контаминиране и др. понастоящем се предлагат над 300 проби за молекулна диагностика за някои синдроми: Ди Джорджи, Дюшен и др. Методът има няколко разновидности - RT-MLPA (обратно-транскриптазен MLPA), MS- MLPA (метилационно специфична MLPA).

- **QF-PCR (количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция)** - количествена флуоресцентна полимеразна верижна реакция). QF-PCR е лабораторна техника, която се използва за амплифициране на специфични ДНК региони и количествено определяне на присъстващата ДНК. Амплифицират се микросателитни ДНК-секвенции, състоящи се от тандемни повтори, известни като STRs (Short Tandem Repeats - къси тандемни повтори). Това са ДНК региони с повтарящи се структури, обикновено 2-6 bp различни при различните индивиди. Количеството на флуоресценция и размера на амплифицираната ДНК, се измерва и съотношенията се представят графично, позволявайки разграничаване на хромозомните региони. Броят на пиковете и височина им показва броя на копията от алели в този регион на ДНК пробата на съответната хромозома. QF-PCR може да се използва за откриване на допълнителни хромозоми (анеуплоидия) при пациенти. Използва се за диагностициране на синдром на Даун, синдром на Едуардс и синдром на Патау, както и за идентифициране на други анеуплоидии.

3.6.3 Молекулярно-цитогенетични методи

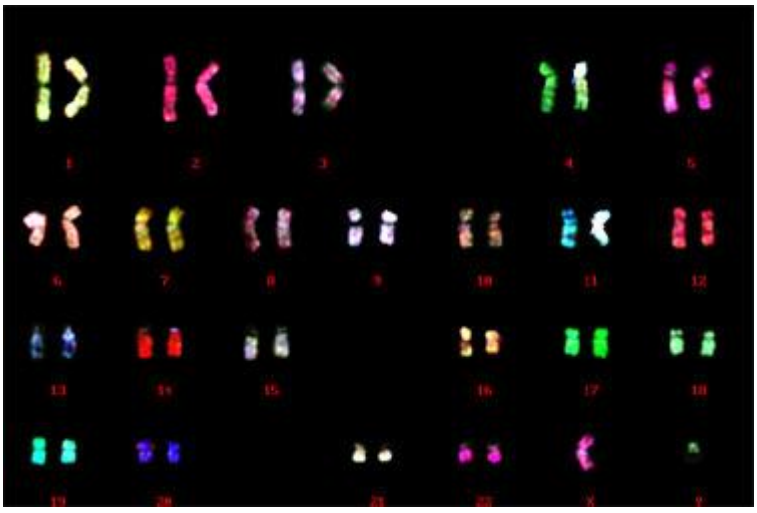
Революция в анализа и характеризирането на хромозомите и хромозомните аномалии е развитието на ин ситу хибридизацията (ISH). Тя се отнася до хибридизиране на комплементарни ДНК или РНК последователности, които служат за сонди. При този подход могат да бъдат разкрити, микроделеционни/микродупликационни аберации, генни преустройства, структурни пренареждания, амплификации асоциирани с неоплазми и др. Тези технологии подобриха значително диагностичните възможности. Сред молекулярно-генетичните методи са: FISH, многоцветен FISH (**M**ultiplex FISH –mFISH и SKY - **S**pectral

Kar**y**otyping), PRINS (**Pr**imed **In** **S**itu Labelling), обратен FISH, fiber-FISH (високорезолютивен FISH върху изтеглена ДНК фибрила), CGH (**C**omparative **G**emomic **H**ybridization - сравнителна геномна хибридизация).

3.6.3.1 FISH анализ

Методът позволява директна визуализация на определени геномни секвенции чрез комплементарно свързване на флуоресцентно белязани проби към метафазни хромозоми или интерфазни ядра. Приложението му е свързано с изброените по-горе аберации, както и за пренатален и предимплантационен анализ. Методът е особено полезен за установяне на хетерозиготни делеции и съответно откриването на носители на болестни мутации. Локус-специфичните проби могат да бъдат BAC-клонове (BAC – **B**acterial **A**rtificial **C**hromosome), PAC-клонове (PAC –bacterial **P**1-plasmid **A**rtificial **C**hromosome), космидни или фосмидни клонове от PCR-продукти. Необходимите BAC- и PAC- клонове за FISH картиране могат да бъдат подбрани от бази данни с картирани и клонирани човешки клонове чрез геномни браузъри като Ensembl или UCSC.

- **Многоцветен FISH -** Методът позволява визуализация на сложни хромозомни преустройства, интерстициални транслокации, които не могат да се идентифицират с други методи. Разновидности на многоцветният FISH са мултиплексен FISH и SKY-метода (фигура 6)



Фигура 6. Многоцветен FISH

- **mFISH анализ -** Това е 24-цветна техника за кариотипиране и е метод на избор за изучаване на сложни междухромозомни преустройства, със специфични за всяка хромозома цветове. Процесът включва три основни етапа, като се използва набор

от хромозома-специфични ДНК проби, които хибридизират върху денатурирани метафазни хромозоми. Използват се изкуствено синтезирани хромозоми на дрожди YAC-хромозоми, белязани с комбинация от флуорохроми. Флуоресцентният анализ изисква CCD-камера (**C**harge-**C**oupled **D**evice - устройство със зарядна връзка) и специализиран софтуер[252].

- **SKY-техника -** Техниката е разработена от Шрок и колеги през 1996г.[253] и комбинира интерферометрия, CCD-визуализация и оптична микроскопия. При тази техника могат да бъдат създадени 31 цвята от пет вида флуоресцентни бои. В действителност, се създават 24 макроскопски различими цвята. Емисионните спектри от всички точки на средата в областта на видимата и близката до инфрачервената част на светлината се измерват едновременно и се създава софтуерно автоматизирано кариотипиране на хромозомния набор. SKY методът осигурява тълкуване на резултати, но не мже да идентифицира структурни аномалии, като инверсия, делеции, инсерции и дупликации на дадена хромозома, тъй като всички те са оцветени с еднакъв цвят.

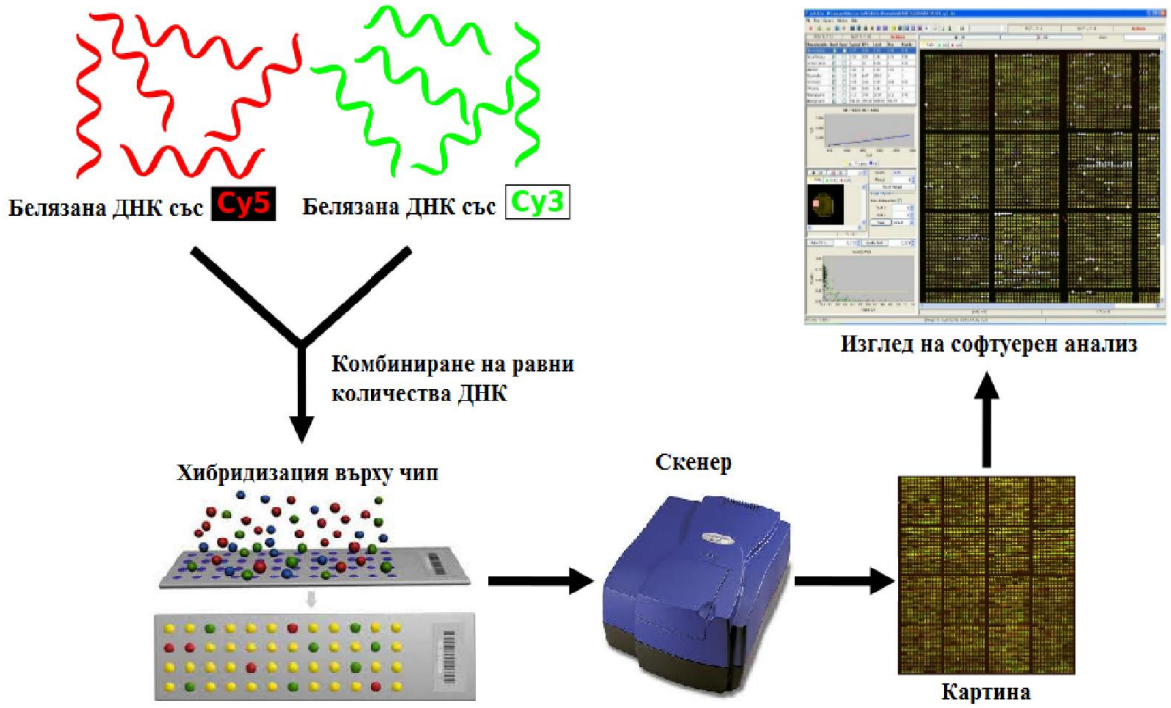
3.6.3.2 Сравнителна геномна хибридизация

Това е метод за детекция на небалансирани геномни промени, но не дава информация за плоидността или локализацията на пренаребданията, отговорни за промяната на броя копия. Първият СГХ анализ е докладван от Kallioniemi и колеги през 1992 г. От университета на Калифорния, при анализ на солидни тумори. Техниката е базирана на конкурентна хибридизация между ДНК от изследваната проба (тест-ДНК) и ДНК от нормални клетки (референтна ДНК), върху нормални метафазни хромозоми. Тази техника е разработена първоначално за сравняване на хромозоми от туморни клетки и нормална тъкан[254]. Резолюцията на метода е по-висока от конвенционалното кариотипиране и FISH метода[255]. СГХ позволява анализ на целия геном за допълнителен или липсващ генетичен материал в единичен експеримент и не изисква метафази от пациента. Освен това може да се проведе и при наличие на малък брой високопречистени клетки. При СГХ тестовата и референтната ДНК се смесват в съотношение 1:1 след белязване с различни хаптени. Двете ко-хибридизират върху нормални метафазни клетки, като хомоложните секвенции в двете вериги се конкурират за едни и същи таргетни места. Хибридизиралите референтна и тест-ДНК молекули се идентифицират чрез хаптен-специфични лиганди, свързани с различни флуорохроми, обикновено флуоресцеин изотиоцианат зелено – за референтната ДНК и родамин – червено – за тест-ДНК. Количеството на двете изследвани ДНК-и, се

определя чрез измерване на флуоресцентното съотношение (FR) червено:зелено, което трябва да бъде 0.5, 1.0 или 1.5 за локусите, които присъстват в тест-ДНК, съответно в 1, 2 или 3 копия. Интерпретация на СГХ обикновено изисква софтуерен анализ.

3.6.3.3 Молекулярно кариотипиране

Въпреки надеждността на рутинния цитогенетичен анализ, резолюцията на метода остава ниска 5-10Mb, поради което немалка част от хромозомните аберации водещи до поява на ВА и ИН остават неразкрити. Диагностиката се подобри значително след въвеждането на по-високо резолютивни техники като FISH, QF-PCR, като и двата метода не позволяват цялостен геномен анализ и изискват предварителна информация за мястото и типа на хромозомната аберация. Развтието на СГХ е свързано с цялостния геномен скрининг. Методът е разработен за идентифициране на небалансирани хромозомни аберации в рамките на един експеримент, но резолюцията му е само 3-10 Mb, в сравнение с резолюцията на кариотипирането и затова се въвежда по-нова молякулярно-генентична техника - микрочиповата сравнителна геномна хибридизация (Array comparative genomic hybridization - array CGH/ aCGH). Според някои данни конвеционалната цитогенетика и FISH методът установяват хромозомни аберации при около 10% от пациентите с дисморфизъм и/или интелектуална недостатъчност, а array CGH анализа успява да разкрие хромозомните аномалии при 2 пъти повече пациенти (20%)[256]. Това позволява детайлно идентифициране на аберации. Въпреки, че микроскопска хромозомна визуализация не е възможна, терминът „молекулно кариотипиране" се използва като аналогия на конвенционалното кариотипиране. Array CGH е специфичен, чувствителен, бърз и високопродуктивен метод, със значителни предимства в сравнение с други методи, използвани за анализ на ДНК.(фиг.7)



Фигура 7. Схематично представяне на микрочипова технология.

При тази технология метафазните хромозоми са заменени с картирани и секвенирани геномни клонове, приложени върху микрочипове в присъствие на Cot-1-ДНК, блокираща повтарящите се последователности. Технологията е разработена в края 90–те години от Solinas-Toldo и сътр. и Pinkel и сътр.[257, 258] и включва белязване с флуоресцентни багрила Cy3 (Cyanine 3 - зелена флуоресценция) за контролната ДНК и Cy5 (Cyanine 5 - червена флуоресценция) – за тестваната. Двете ДНК трябва да съвпадат по пол, като контролната може да бъде избрана от здрави индивиди или от комерсиално достъпни контролни ДНК-и. Първоначално ДНК се третира с ДНК-аза, и се създават едноверижни никове, като впоследствие се добавя и ДНК-полимераза с 5'->3' екзонуклеазна активност, удължаваща 3'-хидроксилния край, като заменя небелязаните нуклеотиди с радиоактивно или флуоресцентно белязани dNTPs (Deoxyribonucleotides Triphosphate). Следва лигиране на никовете чрез ДНК-лигаза или използването на свободната 3'-хидроксилна група като матрица за действието на ДНК-полимераза I. След хибридизирането на двете белязани ДНК-и, следва промиване и детекцията на флуоресцентните сигнали посредством микрочипов скенер. Интензитетът на Cy3 се измерва при 532 nm дължина на вълната, а на Cy5 при 635 nm. Чрез софтуерна програма образите се анализират и се изършва калкулация на

съотношението Cy3/Cy5 като двоичен логаритъм. При еквивалентни интензитети на Cy3 и Cy5 в дадена точка резултатът се интерпретира като нормален. При при стойности на съотношението над определена стойност се приемат за амплификация, а при стойности под определена граница – като делеции.

Високите резолютивни възможности на метода подпомогнаха значително идентифицираното на нови гени, описването на нови синдроми,[259-262] което в комбинация със секвениране от следеващо поколение ще даде силен тласък на диагностиката и превенцията на вродени дефекти и ИН. Array CGH е метод подпомагащ изучаването на раковите клетки[257,263,264], диагностиката на пациенти с множествени вродени малформации и/или интелектуална недостатъчност, както и метод на избор в пренаталната[265,266] и предимплантационната генетична диагностика[267,268]. Състоянията на мозаицизъм както и видимо балансираните преустройства също биват идентифицирани в по-голям процент и с по-голяма точност при използване на микротипова СГХ. Array CGH е с по-голяма чувствителност по отношение на нискостепенен мозаицизъм[269,270]. Някои изследователи като Роберто Вали демонстрират добрите възможности на микротипова СГХ по отношение на детекция на мозаицизъм. Те създали изкуствен мозаицизъм чрез смесване на ДНК от трима пациенти, постигащи общо седем хромозомни аберации. Имитирани са 5%, 6%, 7%, 8%, 10% и 15% нива на мозаицизъм. Array CGH се оказва в състояние да идентифицира 8% съдържание на анормални клетки в тъканта[271]. Видимо балансираните структурни преустройства се срещат при 0,6% от пациентите с вродени дефекти и ИН.[272], като много често се наблюдават отклонения във фенотипа поради наличие на различни механизми на засягане на гените в хромозомите, като директна увреда на гени[273] и позиционен ефект[274] и др. Прилагането на по-мощни техники за детекция на този тип преустройства като FISH и микрочипова СГХ помогна за идентифицирането им. Установи се, че тези преустройствата могат да бъдат много сложни и да засягат едновременно няколко хромозоми[275,276], както и че аберациите могат да възникват не само в типичните за тях райони. Малки, скрити, патологични дисбаланси могат да бъдат открити на нетипични за тях места[275-278].

Микрочиповата СГХ се очерта като много надежден метод, който обаче има и своите недостатъци. Моногенните дефекти, балансираните транслокации и кратните промени в хаплоидния хромозомен набор не могат да бъдат идентифицирани с метода. Тази технология отчита количествени, а не качествени промени в тестваната и контролната ДНК. Освен това могат да възникнат грешки при отчитането на

резултатите поради способността на някои гени да се свързват в различна степен с използваните багрила (Cy3 и Cy5), като проблемът може да бъде решен чрез размяна на флуорохромите при двете ДНК –и.

Напредването на технологиите изисква разработване на платформи със все по-голяма резолюция, което изисква използване на микрочипове със все по-голяма гъстота на ДНК клоновете[278]. Използваните микрочипове могат да бъдат разграничени по няколко критерии.

- **Видове микрочипове**
- **Обхват на анализа**

✓ **Таргетни чипове** – дават информация за региони, отговорни за известни микроделеционни/микродупликационни синдроми, но не и за останалата част от генома.

✓ **Чипове за цялостен геномен анализ** – дават информация за целия геном и увеличават откриваемостта с 5% в сравнение с таргетните чипове[279].

- **Вид на анализа**

✓ **Експресионни чипове** – извършва се изолиране на геномна РНК и превръщането ѝ в кДНК, хибридизираща върху едноканални или двуканални чипове, съдържащи олигонуклеотиди от целия геном[280]. Подвид на експресионните чипове са miRNA (микро РНК) чиповете.

✓ **Чипове за метилационен анализ** – поради значението на метилирането за експресията на гените са въведени метилационните чипове, при които двете ДНК-и хибридизират върху BAC или олигонуклеотидни секвенции. Използва се двуканален подход.

✓ **CNVs чипове –** осъществява се конкурентна хибридизация между различно белязани с флуорохроми контролна и тествана ДНК.

✓ **ChIP-on-chip чипове** – комбинира се хроматинна преципитация с микрочипова технология.[281,282]

- **Дължина на използваните ДНК-секвенции**

✓ **BAC-микрочипове (BACs-, PACs- и YACs-клонове) –** това са най-големите по размер клонове използваните при направата на микрочипове с дължина от 100 до 200 Kb и са. широко използвани са и осигуряват измерване брой копия в широк диапазон от делеции до амплификации[257], но размерите им могат да резултират и в неспецифична хибридизация.

✓ **Фосмидни и космидни клонове** – Дължина им е ~40 Kb. Малките им размери допринасят за добра резолюция от около 20 kb, търпяща корекция до 15 kb.

✓ **Геномни PCR продукти –** имат добра резолюция, но по-лошо съотношение SBR (Signal to Background Ratio)[283,284]. Недостатък на метода е механичното накапване на ДНК разтвора върху микроскопско стъкло, което не позволява фиксирането на повече от 60 000 елемента и ограничава постигането на много висока резолюция.

✓ **Комплементарни ДНК микрочипове** – чрез специфични праймери се амплифицират конкретни гени и се генерират кДНК проби, които фиксират на предметно стъкло[285]. Технологията позволява с много висока резолюция анализ на единични гени[278].

✓ **Олигонуклеотидни микрочипове –** това са микрочиповете с най-голяма резолюция използващи едноверижни 25 до 85 bp олигонуклеотидни елементи[286,287]. Теоретично, един микрочип може да съдържа 4.2 милиона ДНК секвенции с резолюция близка до конвенционалното ДНК секвениране (1–800 bp)[278]. Недостатък на платформата е по-ниското съотношение между интезитета на сигналите и фоновия шум.

✓ **SNPs-чипове** – Конструират се също от олигонуклеотиди и се наричат още генотипиращи чипове. Използват се за сравняване на алелните и генотипните честоти на огромен брой ДНК полиморфизми между неродствени пациенти и незасегнати индивиди от една и съща популация[288]. Тези чипове са много полезни при анализ на кандидат гени свързани с различни мултифакторни заболявания.

- **Условия на хибридизация на белязаната тествана ДНК**

✓ **Едноканални чипове** – Използват се за експресионен анализ. Тестваните проби се оцветяват с един и същи флуорохром и се провеждат две независими хибридизации върху отделни чипове.

✓ **Двуканални чипове** – двете проби ДНК (обикновено контрола срещу пациент), се белязват с два различни флуорохрома

- **Техника на конструиране на ДНК секвенциите върху микрочипа**

✓ **Шаблонни микрочипове –** извършва се синтезиране „in situ" на ДНК секвенции по определена матрица върху плоска повърхност чрез накапване. При този метод често се установяват разлики между чиповете от различните серии, поради различна влажност по време на накапването, дефект в накапващите игли, по-високо съдържание на озон в средата.

✓ **Рандом микрочипове –** при този подход ДНК секвенциите се прикрепват предварително към гранули, които се фиксират върху кладенчета създадени върху силиконов носител. След хибридизация със специфични белязани компоненти, комплементарни на последователностите прикрепени към гранулите, се извършва идентификация на всяка от тях .

3.7 Превенция на нарушенията в развитието.

Вродени аномалии водят до нарушения в развитието поради което представляват сериозен проблем за засегнатите, семействата им и популацията като цяло. Имат две основни медицински характеристики: 1) Това са вродени дефекти с ограничена възможност за пълно възстановяване и 2) Имат ранно начало. Поради тези причини има само един оптимален вариант за справяне с проблема и това е превенцията. Превантивните мерки за общественото здраве работят за намаляване на честотата на някои вродени аномалии чрез отстраняване на рисковите фактори или засилване на протективните мерки. Според СЗО (2016г.) тези интервенции и усилия включват:

- Осигуряване на младите момичета и майки здравословна диета включваща голямо разнообразие от зеленчуци и плодове, както и поддържане на здравословно тегло.
- Осигуряване на адекватен прием на витамини и минерали, и особено фолиева киселина в подрастващите момичета и майки.
- Избягване на прием на вредни вещества, особено на алкохол и тютюневи изделия.
- Избягване на пътувания на бременни жени (а понякога и жени в детеродна възраст) в региони с огнища на инфекции, свързани с повишен риск от развитие на вродени аномалии.
- намаляване или предотвратяване на експозицията на опасни вещества (като тежки метали и пестициди) от околната среда по време на бременност.
- контролиране на диабета преди и по време на бременността чрез консултиране със специалист, мониторинг на: тегло, диета и апликация на инсулин, при необходимост.
- Гарантиране на това, че всяко медициране или облъчване на бременни жени е оправдано и е извършено при внимателна преценка на рисковете и ползите.
- Провеждане на стриктни ваксинации на децата и жените, особено срещу вируса на рубеола.

- Подобряване на здравната култура на персонала и всички участващи в насърчаването на превенцията на вродените аномалии.
- Провеждане на скрининг за инфекции, особено рубеола, варицела и сифилис и провеждане на съобразено със състоянието лечение.

3.7.1 Детекция

Периодът преди и около концепцията е много важен за откриване на рискове от поява на вродени дефекти. Поради това здравеопазването е предвидило многобройни консултации и генетични скринингови програми. Скринингът може да бъде 3 вида според периода на провеждане:

- **Преди планиране на бременност** – скринингът през този етап служи за идентифициране на риск от поява на вроден дефект унаследен от родителите и включва снемане на богата фамилна анамнеза, скрининг за носителство, като това е особено важно в общества с разпространени кръвнородствени бракове.
- **Около и по време на бременността** – особености в здравословното състояние на майката могат да увеличат риска от поява на вроден дефект. Скрининговите програми могат да осигурят откриването и лекуването своевременно на такива състояния ако е възможно. Скринингът може да се извърши във връзка с възрастта на бременната, за употреба на алкохол, цигари, и други рискове. По време на първия триместър ултразвуковата диагностика в комбинация с биохимичен скрининг са с голямо значение за детекция на малформативни синдроми като Даун, Едвардс, Патау, ДНТ и др. Ултразвуково изследване през втори и трети триместър дава информация за наличие на структурни аномалии типични за тези периоди (деформации, дисрупции) или сърдечни аномалии. Майчина кръвна проба може да бъде използвана за източник на фетална ДНК за скриниране на много хромозомни аномалии. При необходимост амниоцентеза и хорионбиопсия могат да бъдат използвани за диагностика на аномалии при жени с висок риск.
- **Неонатален скрининг** - включва клиничен преглед и скрининг за метаболитни, хормонални и заболявания на кръвта, скрининг за глухота и сърдечни дефекти, както и за ранно откриване на вродени аномалии, което може да улесни животоспасяващо лечение и да предотврати прогресията на някои физически, интелектуални, зрителни или слухови увреждания. В някои страни, както и в България, новородените са рутинно изследвани за аномалии на щитовидната жлеза или надбъбречните жлези преди изписване от болничното звеното.

3.7.2 Лечение и грижи

Много структурни вродени аномалии могат да бъдат хирургично коригирани, а при някои състояния като таласемия, вроден хипотироидизъм и др. може да се прилага ранно лечение.

В доклад, придружаващ резолюцията на Шестдесет и третата Световната здравна асамблея (2010) на вродените аномалии, се описват основните компоненти за създаване на национална програма за наблюдение, профилактика и лечение на вродените аномалии, преди и след раждането. Също така се препоръчват приоритетно създаване и укрепване на тези национални програми с помощта на международната общност[289] - World Health Assembly report on birth defects).

Програмата "Глобална стратегия за женско, детско и юношко здраве, 2016-2030 "има за цел да постигне най-високия постижим стандарт на здравеопазване за всички жени, деца и юноши, за да се гарантира за вбъдеще, че всяко новородено, майка и дете не само ще оцелее, но и ще „процъфтява". Обновена през 2015 г. чрез сътрудничество със заинтересованите страни, задействана от СЗО, стратегията се основава на успеха на тази от 2010 г. и движението "Всяка Жена всяко дете", която подпомогна постигането на успехите на платформата: „Целите на хилядолетието за развитие" стремяща се да постави жените, децата и юношите в основата на новата платформа „Целите на ООН за устойчиво развитие"[290]- (Global Strategy for Women's, Children's and Adolescents' Health, 2016-2030)

СЗО работи в сътрудничество с центровете за контрол на заболяванията в САЩ, с Националния център за превенция на вродени дефекти и нарушения в развитието и други партньори, за създаване на глобална политика за повишаване употребата на фолиева киселина. Работи се и с партньори, за осигуряване на необходимата техническа експертиза свързана с проследяване честотата на ДНТ , съдържанието на фолиева киселина в храните и подобряване на капацитета на лабораториите за оценка на рисковете свързани с приема на този витамин. Наблюдават се рисковете и от развитие на ВА при новороденте на жените, приемащи антиретровирусни лекарства по време на бременност, като неразделна част от наблюдението и оценката на националните програми за ХИВ. Осигуряват се и ваксини за подпомагане на страните с ниски и средни доходи в борбата със синдрома на вродената рубеола. Разработват се и програми за укрепване на медицинска помощ и рехабилитационни услуги за хора с нарушения в развитието[291]- (United Nations Convention on the Rights of Persons with Disabilities). Работи се по

проекти съсредоточени върху детската уязвимост от замърсения въздух, вода, липса на канализация, наличие на токсини, тежки метали, отпадъци и радиация. През 2016г. поради честотата на Зика вирусните инфекции, водещи до развитие на микроцефалия, вродени малформации, неврологични синдроми и др., се предприеха спешни мерки за наблюдение и ограничаване на огнищата, въвеждане на лични предпазни средства, грижа за хората и семействата с потенциални усложнения.

.

3.8 Обобщение

Микрочиповата СГХ е технология с много предимства, позволяваша детекция на патологични субмикроскопски хромозомни нарушения при пациенти с аномалии в развитието. Високата й резолюция я прави метод на избор при откриване и анализиране на нови кандидат гени. Способства за откриването на нови генотип-фенотипни корелации, което е от съществено значение за медицинската генетика като специалност и за пациентите в частност. Основното предимство на aCGH е възможността за едновременното откриване на анеуплоидии, делеции, дупликации, и други сложни преустройства неидентифицирани с други методи. В действителност, единичен анализ с микрочипова СГХ е еквивалентен на хиляди експерименти с FISH метода, което спестява разходи и труд. В допълнение, aCGH се доказа, че е мощен инструмент за откриване на субмикроскопска хромозомни аномалии при индивиди с идиопатична интелектуална недостатъчност и различни вродени дефекти, каквито са обсъжданите пациенти в дисертационния труд. Няколко мащабни проучвания показват, че aCGH открива 10% -20% от хромозомните аномалии при деца с ИН и забавяне в развитието с или без вродени аномалии и само 3% -5% от тези аномалии ще бъде открити с други методи. Тъй като количествените вариации в човешкият геном се оказват от голямо значение за нормалното развитие и функциониране, систематизираното и задълбочено проучване на тези изменения би могло да отговори на много въпроси свързани с фенотипните прояви при пациенти с привидно нормален генотип.

4 Цели и задачи

4.1 Цели

Целта на настоящата десертация е да се характеризират вариациите на броя копия в генома на деца с вродени аномалии и да се определят генетични нарушения, които играят етиологична и патогенетична роля.

4.2 Задачи

1. Да се определи честотата и типа на геномните нарушения в изследваната група лица чрез сравнителна геномна хибридизация върху микрочипове.
2. Да се характеризират патологичните вариации на броя копия в генома на деца с вродени аномалии и да се определи съдържанието на гени в тях.
3. Да се направи корелация между патологичните находки и клиничния фенотип.
4. Да се определи честотата и типа на новите варианти в броя на копията в генома на деца с вродени аномалии с неясно клинично значение и да се прекатегоризират според разработени критерии.
5. Да се създаде банка от ДНК-и на деца с вродени аномалии за настоящи и бъдещи изследвания.

5 Материали и методи

5.1 Участници в проучването

Изследваната група включва 81 пациенти с нарушения в развитието: дисморфични характеристики, съпроводени или не от интелектуална недостатъчност, поведенчески проблеми, изоставане във физическото развитие, нарушения на ЦНС и други органи и системи. Според някои автори небалансирани геномни преустройства с малки размери са най-честата причина за възникване на посочените симптоми[292]. Пациентите са изследвани и с цитогенетичен метод, резултатите, от който показват нормален кариотип при всички лица. От общата група изследвани пациенти, 54 са от мъжки пол, а 27 – от женски пол. Всички участници са запознати с изследването чрез писмена форма „Информация за участниците" и техните родители/пълномощен представител, са подписали информирано съгласие за участие.

5.2 Биологични проби

При спазване на стандартните процедури за стерилност, от всеки пациент е взета венозна кръв за изолирането на ДНК с последващо събирана на материала във вакутейнери с EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) (4 ml). Кръвта е вземата до час след нахранване и е съхранявана на +4ºC до транспортирането й в лабораторията на Катедрата по медицинска генетика. ДНК е изолирана в рамките на 24 часа след вземането на кръвта. След това ДНК е съхранявана в разтворено състояние в ТЕ буфер при -20ºC в ДНК-банката на Катедрата. При провеждане на експериментите са спазени всички процедури по безопасност включващи употреба на ръкавици, очила, ламинарни боксове, отделни стаи за ДНК изолиране, стерилни камери, стерилни съдове, специални контейнери за отпадъците.

5.2.1 Използвани методи

В настоящата дисертационен труд са приложени следните методи:

- Фенол-хлороформна екстракция на високомолекулна ДНК от венозна кръв;
- Хоризонтална гел-електрофореза и спектрофотометрично измерване на качеството и концентрацията на ДНК.
- Сравнителна геномна хибридизация върху олиго ДНК-микрочипове.

5.2.1.1 Фенол-хлороформна екстракция на високомолекулна ДНК от венозна кръв

Високомолекулната ДНК, необходима за изследването, е изолирана чрез фенол-хлороформна екстракция. Методът се основава на извличането на белтъци и други съставки от клетъчен лизат в органична фаза, като ДНК остава във водната фаза и се преципитира с алкохол.

Реактиви: лизиращ буфер (pH 7.4, 155 mM NH_4Cl, 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM Na_2EDTA); нуклеолизиращ (SE) буфер (pH 8.0, 75 mM NaCl, 25 mM Na_2EDTA), 10% натриев додецил сулфат (SDS - Sodium Dodecyl Sulfate), 20 mg протеиназа К, 70% и 96% етилов алкохол, стерилен ТЕ-буфер (pH 8.0, 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA).

Апаратура: центрофуга Rotina 46, устройство за разбъркване Vortex-Genie 2, термостат на 37^{o}C.

Техника:

- Взимат се 10 ml периферна кръв в епруветки с Na_2EDTA като антикоагулант;
- Кръвта се прехвърля в 50 ml пластмасова стерилна епруветка;
- Добавят се 30 ml прясно приготвен лизиращ буфер (pH 7.4). За да се лизират еритроцитите, епруветките се обръщат леко няколко пъти, след което пробите се оставят за 30 min на лед. Центрофугират се на 2500 rpm на 4°C за 15 min. Супернатантата се отстранява, утайката се разбърква и стъпката се повтаря отново;
- Получената утайка от бели кръвни клетки се разтваря в 3 ml SE буфер чрез разбъркване. Добавя се 300 μl 10% SDS разтвор и 50 μl от 20 mg/ml разтвор на протеиназа К;
- Сместа се инкубира на 37°C за една нощ или на 55°C за 5 часа до получаване на вискозен разтвор;
- Добавя се равно количество (около 3 ml) фенол, еквилибриран с 0,5M Tris Cl (pH 8.0) и се разбърква на вортекс за 15 sec;
- Центрофугира се на 3000 rpm на стайна температура за 15 min. Ако органичната и водната фаза не са добре разделени, се центрофугира отново за по-дълго време или на по-висока скорост;
- Водната фаза се пренася в чиста епруветка с пастьорова пипета (за малки обеми (<200 μl) се използва автоматична пипета);

- Добавя се равно количество фенол:хлороформ:изоамилов алкохол (25:24:1=vol:vol:vol), разбърква се на вортекс и се центрофугира на 3000 rpm на стайна температура за 15 min;
- Горната водна фаза се прехвърля в чиста центрофужна епруветка и се прибавя равно количество хлороформ:изоамилов алкохол (24:1=vol:vol) и епруветката се разбърква на вортекс;
- Центрофугира се на 3000 rpm на стайна температура за 15 min;
- Водната фаза се прехвърля с пастьорова пипета в чиста епруветка;
- Добавят се 3 обема ледено студен абсолютен етанол (96%). Епруветките се обръщат, докато разтворът се разбърка добре. ДНК преципитира веднага, след което може да бъде извадена от етанолния разтвор със стерилна пастьорка;
- Ако ДНК е фрагментирана, се налага центрофугиране на 5000 rpm за 5 min на стайна температура;
- ДНК преципитатът се промива два пъти в 70% етанол и се изсушава на стайна температура при отворена епруветка, докато и последните видими останки от етанола се изпарят;
- Добавят се 500-1000 μl стерилен ТЕ буфер;
- Епруветките се поставят на ролер докато ДНК напълно се разтвори (12-24 часа);
- Изолираната ДНК се съхранява на -20°C.

5.2.1.2 Хоризонтална гел-електрофореза за измерване на качеството на ДНК и спектрофотометрично измерване на концентрацията на ДНК.

Електрофоретична оценка на качеството на изолираната ДНК

Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза дава възможност ДНК фрагментите да се разделят според заряда и молекулната си маса. Затова тази техника е използвана за определяне на количеството и качеството на тестваната и контролната ДНК. Разтвореният в агарозния гел етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК под действието на UV- светлина.

Реактиви: 10×TBE електрофоретичен буфер (pH 8.0, 90 mM Tris-HCl, 90 mM борна киселина, 1 mM Na_2EDTA); 1% агароза (Agarose GibcoBRL) в 1×TBE електрофоретичен буфер; 10 mg/ml етидиев бромид, разтвор за нанасяне на пробите (6x).

Апаратура: нагревателен уред с магнитна бъркалка за разтапяне на агарозата; нивелирана масичка за изливане на гела; апарат за хоризонтална електрофореза

(GibcoBRL, Horizon 20-25); пластмасова вана за изливане на агарозния гел със стартови гребени, токоизправител (Gibco BRL, PS 3002); UV-трансилюминатор с дължина на вълната 315 nm.

Техника:

- Приготвя се 2% агарозен гел: 2 g агароза в 100 ml 1×TBE буфер;
- Приготвената смес се вари на нагревателен уред с магнитна бъркалка до пълното стапяне на агарозата;
- Изчаква се температурата да спадне до 60-65°C, след което се добавят 2 μl етидиев бромид;
- Гелът се излива във ваничката, върху която предварително е поставен стартовия гребен и се изчаква до пълното му полимеризиране.
- Приготвя се микс за гела: 3 μl ДНК в 3 μl син разтвор за нанасяне на пробите;
- Електрофоретичната вана се напълва с 1×TBE буфер така, че да гелът да е изцяло покрит;
- Под буфера в стартовите ямки на агарозния гел се накапват по 6 μl от микса за всяка проба;
- Разделянето се извършва при подавано напрежение от 80 V/cm;
- Фрагментите се визуализират с UV светлина при 315 nm дължина на вълната;
- Гелът се оставя да тече в продължение на 30 min, след което гелът се заснема. Високомолекулната ДНК се визуализира като тесни, ясно флуоресциращи ивици в гела.

Спектрофотометрична оценка на концентрацията на изолираната ДНК

Методът се основава на специфичното поглъщане на светлина с дължина на вълната γ=260 nm от пуриновите и пиримидиновите бази в ДНК. Използваната апаратура е NanoDrop® ND-2000 - спектрофотометър, работещ с обеми от 1-2 μl. Препоръчително е съотношенията на чистота да бъдат: OD 260/280 = 1.8-2.0; OD 260/230 > 2.0.

5.2.1.3 Сравнителна геномна хибридизация върху 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).

Реактиви

- Мъжка и женска контролна ДНК;

- Кит за флуоресцентно белязване 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;
- TE буфер;
- Свободна от нуклеази вода;
- Олигонуклеотидни микрочипове, формат 4x44K, покриващи целия геном с резолюция 70 kb (килобази) CytoChip Oligo, версия 1.1., (BlueGnome, Cambridge, UK). Тези микрочиповете имат четири отделни полета за хибридизация и дават възможност за едновременен анализ на четири 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 и 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.

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.

Техника

- **Подготовка на пробата**

Използва се разтворена в TE 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. Тестваните ДНК на пациентите и контролните ДНК-и се разреждат със свободна от нуклеази дестилирана H_2O до 150 ng/µl работна концентрация.

- **Белязване**

Белязването се осъществява на принципа на nick транслацията. Използват се рандом праймери за белязване на тестваната и контролната ДНК с различни флуорохроми, които имат различен емисионен спектър. При белязването 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, 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 белязване (labeling mix)

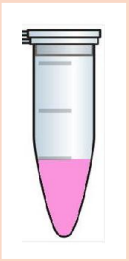
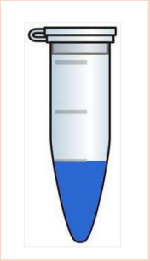
Компоненти	**Cy3 смес за белязване на 8 реакции**		**Cy5 смес за белязване на 8 реакции**	
5xРеакционен буфер		85 µl		85 µl
10xdNTP - смес за белязане		42.5 µl		42.5 µl
Cy3dUTP		25.5 µl		
Cy5 dUTP				25.5 µl
Exo-Klenow ензим		8.5 µl		8.5 µl
Общо		161.5 µl		161.5 µl
За 1 реакция		**19 µl**		**19 µl**

Таблица 4. Необходими реактиви за белязване на 16 реакции за олиго-микрочипов анализ.

- Смесване на ДНК-те със сместа за белязване

Във всяка епруветка, съдържаща ДНК и праймери (общ обем 31 µl) се добавят по 19 µl от сместа за белязване, като тестваната ДНК се смесва със Cy3, а 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.

- Белязване в термоциклер

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

- **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 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.

- Проверка на концентрацията на ДНК и качеството на белязване

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. Белязването 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, белязана със Cy3 се комбинира със Cy5-белязана контролна ДНК , като се съблюдава съвпадение по пола на пациента и контролата.

- **Хибридизация**

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

- Приготвяне на хибридизационна смес

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

- ✓ 130 µl 2x хибридизационен буфер (Hi-RPM)
- ✓ 26 µl 10x блокиращ агент (вортексира се преди употреба)
- ✓ 25 µl човешка COT ДНК

- 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 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. 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 24 часа в предварително подгрята до 65°C печка с ротатор на 20 оборота за 1 min.

➢ **Промиване**

Хибридизиралите чипове се промиват за отстраняване на несвързаната белязана ДНК. Предварително се приготвят следните разтвори на таблица 5:

Буфер	Обем	Температура	Шейкър
Олиго буфер 1	400 ml	Стайна температура	Не
Олиго буфер 1	400 ml	Стайна температура	Да
Олиго буфер 2	400 ml	37°C	Не

➢ **Стопиране на хибридизацията**

На 24-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 буфер 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 буфер 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.

- **Сканиране на микрочиповете**
- Пресканиране

По време на пресканирането 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 сканиране, съвпадаща с хибридизационното поле, като по този начин се намалява нивото на фоновия шум.

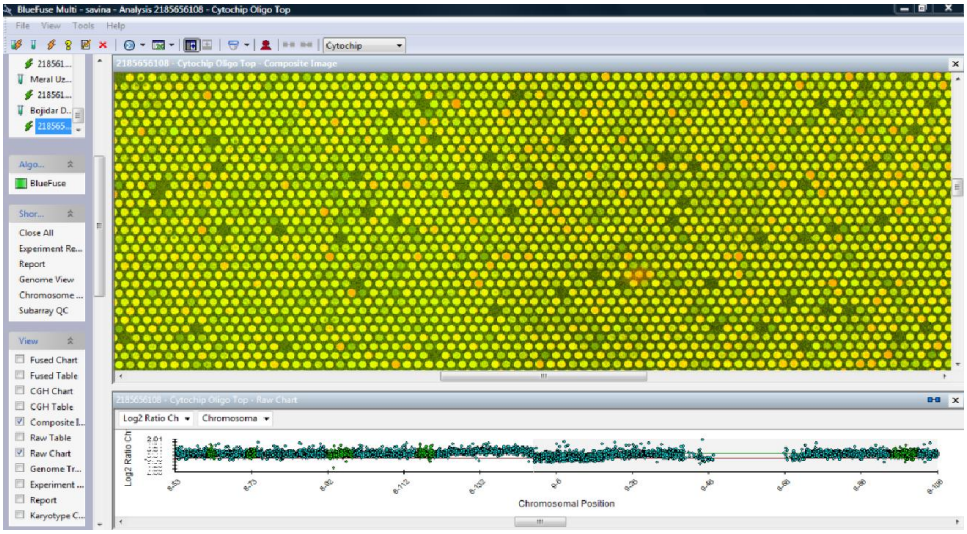
- Сканиран**е**

Препоръчително е микрочиповете да се сканират същия ден, защото багрилата, особено Cy5, много бързо се разрушават под действието на атмосферния озон и светлината. Cytochip Oligo микрочиповете бяха сканирани на двуканален лазерен скенер GenePix 4100A, с 532 nm дължина на вълната за зеления лазер и 635 nm за червения лазер. Чиповете бяха сканирани с резолюция от 5μm. По време на сканирането 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.

- **Софтуерен анализ на данните**

Всички данни са обработени с програма BlueFuse Multi version 4.2.(20289), (BlueGnome, Cambridge) (Фиг. 8). 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

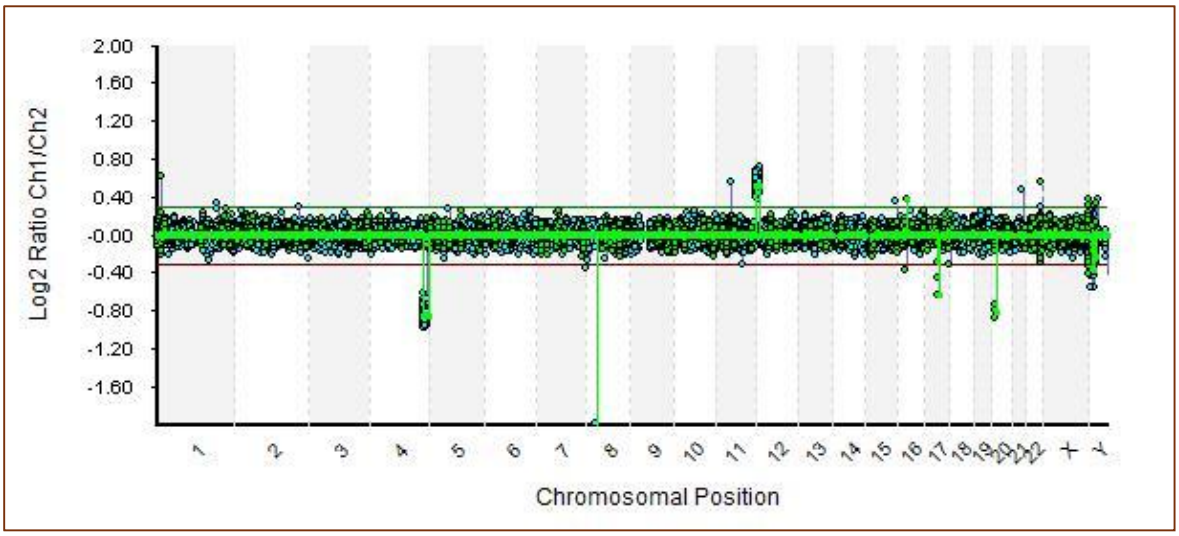
интензитетите на Cy3 и Cy5 се извършва спрямо целия набор от реплики върху чипа. Калкулира се съотношението Cy3/Cy5 (при тест-ДНК, белязана със Cy3) и се взема средната стойност на това съотношение от репликите за всеки клон.



Фигура 8. Образ на сканираните ДНК-фрагменти върху олиго-чип.

- **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) (Фиг. 9).



Фигура 9. ДНК профил с едновременно наличие на дуплликация и делеция в тестваната ДНК**.**

- 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

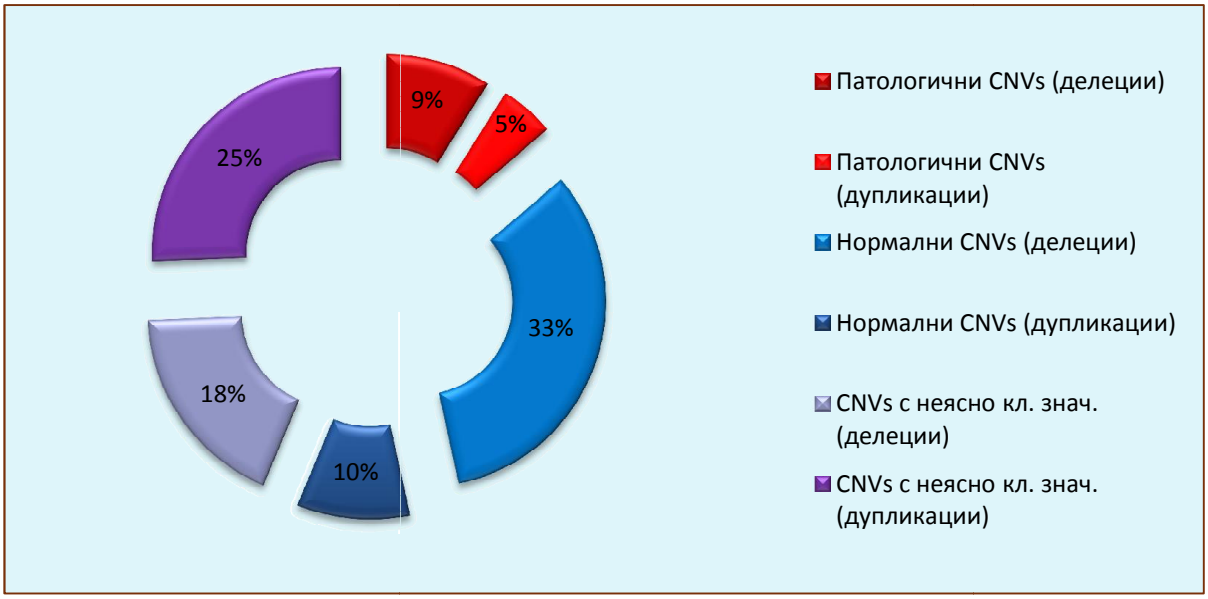
Референтни граници 0.07-0.17. SD отразява разпределението на log2 съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.

- SBR

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

6 Резултати

Високата резолюция на ДНК - микрочиповете и голямата достоверност на резултатите правят тази технология все по-предпочитана особено при нужда от доказване на по-малки хромозомни аберации оставащи скрити за цитогенетичния анализ. Поради това е метод на избор и в настоящото изследване, като всички пациенти показаха нормални цитогенетични резултати. От изследваните с микрочипова олиго-СГХ 81 пациенти са открити патологични CNVs при 31 от тях, като при мнозинството от изследваните са намерени и нормални вариации в броя копия (58 пациенти) и вариации с неясно клинично значение (66 пациенти). Общият брой на доказаните вариации в броя копия е 280. От тях 41 са патологични (28делеции, 13 дупликации), 118 нормални (91 делеции, 27 дупликации) и 121 с неясно клинично значение (50 делеции, 71 дупликации) (Фиг.10)



Фигура 10. Разпределение на общият брой установени CNVs.

При седем от пациентите не са идентифицирани CNVs. Размерите на идентифицираните варианти са различни и варират от 100,021 bp до 13,881,527 bp. От тях 169 са делеции, съответно 111 с дуплициран генетичен материал. Най-голямата дупликация е с размер 13,881,527 bp, а най-малкият дуплициран сегмент включва 100,021 bp. Регионът на най-малката делеция обхваща 102,202 bp, а размерът на най-голямата е 12,682,687 bp в (4)(q34.3q35.2) региона: arr 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1.

6.1 Патологични вариации в броя копия

При 7 пациенти от идентифицираните 31, с патологични варианти от цялата изследвана група с микрочипов анализ, са открити общо 9 патологични вариации, асоциирани с фенотипа на пациентите. Вариациите са разпределени върху 8 хромозоми (хромозоми 2, 4, 5, 10, 12, 15, 17, 22). При 2-ма от пациентите (79 и 46) са идентифицирани комбинация от две патологични CNVs в различни хромозоми. Четирима от пациентите са с единична патологична вариация (Пациенти 52, 41, 35 и 30) (Таблица 6). При 7 от аберациите се касае за делетиран генетичен материал, а при 2 за дуплициран. Интерпретацията на останалите варианти беше направена въз основа на: честотата в изследваната група, размера на вариацията, съдържанието на гени в съответния регион и типа на вариацията (делеция или дупликация). За да се оцени клиничното им значение и да се открият нови генотип-фенотипни корелации е необходимо проучване на голям брой пациенти, което ще позволи определяне на честотата и геномното разпределение на патологичните варианти и ще подпомогне изясняването на механизмите за възникването им. Размерът на откритите патологични геномни изменения варира в границите от 300 kb до 13 Mb.

Таблица 6. Пациенти и патологични находки асоциирани с фенотипа им.

Пациенти	Хромо-зома	Тип аберация	Позиция в bp		Размер (bp)	Цитолента	
			Начало	Край		Начало	Край
Пациент 79	2	делеция	50,982,143	51,314,401	332,259	2p16.3	2p16.3
	5	делеция	175,470,501	177,136,261	1,665,761	5q35.2	5q35.3
Пациент 52	10	делеция	122,804,780	135,434,149	12,629,370	10q26.12	10q26.3
Пациент 46	4	делеция	178,213,959	190,896,645	12,682,687	4q34.3	4q35.2
	12	дупликация	230,451	14,111,977	13,881,527	12p13.33	12p13.1
Пациент 41	17	делеция	34,450,435	36,248,889	1,798,455	17q12	17q12
Пациент 35	22	делеция	21,561,492	22,905,039	1,343,548	22q11.21	22q11.22
Пациент 30	15	дупликация	22,765,658	29,030,488	6,264,831	15q11.2	15q13.1
Пациент 24	15	делеция	22,765,658	23,260,485	494,828	15q11.2	15q11.2

При 4-ма пациенти от посочените 31, са разкрити 4 патологични вариации, които не са асоциирани с характерния фенотип (Таблица 7).

Таблица 7. Пациенти и патологични находки неасоциирани с характерният им фенотип.

Пациенти	Хромо-зома	Тип аберация	Позиция в bp		Размер (bp)	Цитолента	
			Начало	Край		Начало	Край
Пациент 44	7	дупликация	115,099,099	116,966,889	1,867,791	7q31.2	7q31.2
Пациент 50	9	дупликация	120,022,793	121,547,117	1,524,325	9q33.1	9q33.1
Пациент 2	16	делеция	28,861,561	29,031,030	169,47	16p11.2	16p11.2
Пациент 53	3	делеция	177,889,843	179,472,535	1,582,693	3q26.32	3q26.33

Клиничното значение на останалите варианти ще бъде разгледано в обсъждането, тъй като тези варианти биват прекласифицирани.

- **Представяне на пациентите с патологични вариации асоциирани с фенотипа.**

6.1.1 Пациент 79

6.1.1.1 Клиничен фенотип

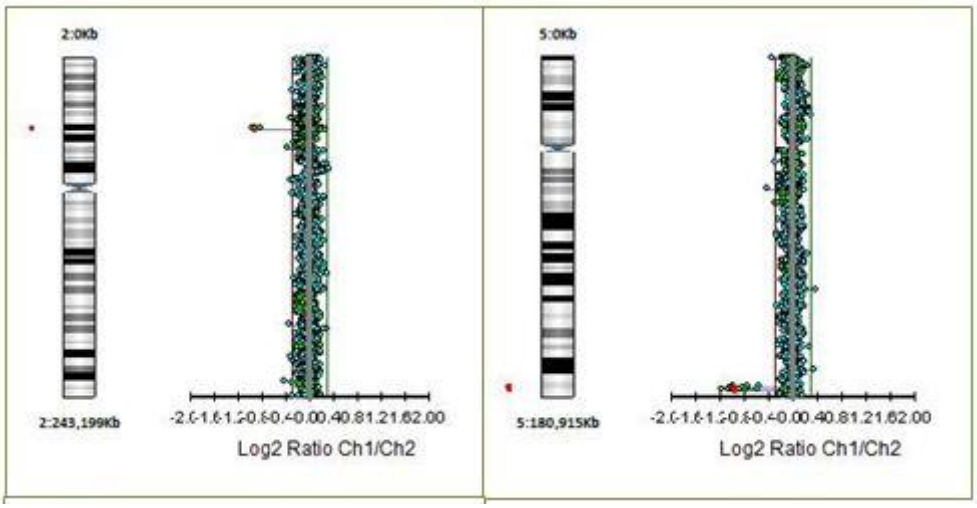
- **Анамнеза**: Касае се за дете, родено от трета непроследявана бременност, протекла с леко сърбящ обрив, в 4 л.м., родено по нормален механизъм с тегло 3,900 гр и дължина 52 см. С незадоволителен тегловен прираст: Двукратно е хоспитализиран в Клинична генетика (на 2 и 6 м. в-ст). От направените тогава изследвания: кариограма, TORCH – норма; ЕхоКГ: трикусподална инсуфициенция -1 ст.; Трансфонтанелна ехография - лека дилатация на задните рога на латералните вентрикули. Хиперехогенности двустранно перивентрикуларно; УЗ бъбреци - хидронефроза I-II ст в дясно; ЕЕГ: парокосизмална абнормност. На двумесечна възраст е започнато лечение с Convulex в доза 1 + 1 + 2 мл (24 мг/кг). Октомври 2014 г. е хоспитализиран в УМБАЛСМ- Пирогов с множество фрактури на ребрата, след което е оставен за отглеждане в ДМСГД-Перник. КТ главен мозък (октомври 2014 г): поренцефална зона в дясно фронто-париетално – исхемични или постисхемични промени, корова атрофия.
- **Статус**: Тегло 8500 гр. (SDS=-1,49), ръст 77 см (SDS=-0,03), обиколка на глава 49 см (SDS= 1,2). Кожа – мургава, редуцирана подкожна мастна тъкан (ПМТ). Долихоцефалия, лицев дисморфизъм: продълговато лице с проминиращо чело, ретрогнатия, депресия в основата на носа, антимонголоидни очни цепки, хипертелоризъм, епикант, дълбоко поставени очи, диспластични ушни миди, проминиращ филтрум. Дихателна система: дихателна честота (ДЧ) 22 /мин., нос –

проходим, дишане – везикуларно. Сърдечно-съдова система (ССС): СЧ 119/мин, ясни тонове, орофаринкс – спокоен. Език – влажен, необложен. Корем на нивото на гръдния кош, меко-еластичен, черен дроб на 1 см под ребрената дъга, слезка на 0.5 см. Пъпна херния. Полова и отделителна системи – б.о. Опорно-двигателна система (ОДС) – двустранна четирипръстна бразда, по-широки палци на стъпалата, повишен мускулен тонус.

6.1.1.2 Резултати от микрочиповия анализ

При микрочиповият анализ са идентифицирани 2 патологични аберации – терминална делеция в късото рамо на 2-ра хромозома – del(2)(p16.3), обхващаща 332,259 bp и терминална делеция дългото рамо на 5-та хромозома – del(5)(q35.2q35.3) с размер 1,665,761 bp.

arr 2p16.3p16.3(50,982,143-51,314,401)x1; 5q35.2q35.3(175,470,501-177,136,261)x1 (Табл. 6, Фиг. 11).



Фигура 11. Резултати от микрочиповият анализ на пациент 79 – делеция в хромозома 2 - del(2)(p16.3) и делеция в хромозома 5 - del(5)(q35.2q35.3).

6.1.2 Пациент 52

6.1.2.1 Клиничен фенотип

- **Анамнеза:** Дете на 3 месечна възраст, родено от първа нормално протекла бременност и оперативно родоразрешение. Тегло - 2800гр, ръст - 49см. Детето е с лицев дисморфизъм и установена след раждането атрезия на ануса, по повод на което е оперирано на 5 дневна възраст – колостомия. По повод на регистриран сърдечен шум е консултирано с кардиолог. Установена е коарктация на аортата и персистиращ

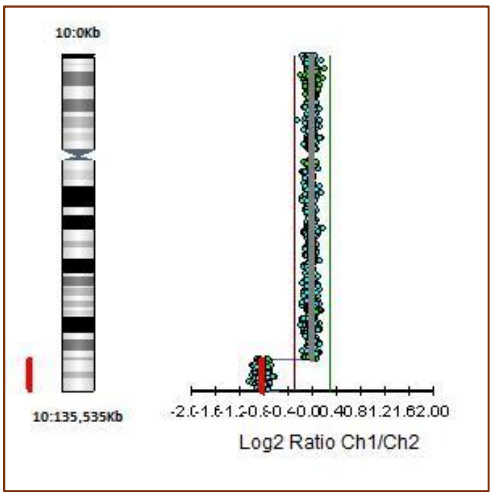
артериален канал - оперативно коригирани. Поради полималформативен синдром детето е насочено за уточняване.

- **Статус:** Тегло- 3160кг (SDS= - 3,99), ръст - 54см (SDS= - 2,39), обиколка на глава- 36см (SDS= - 3,43). Кожа- -розова, запазени тургор и еластичност. Периферни лимфни възли (ПЛВ) - не се палпират увеличени. Фациес – дисморфичен, лек хипертелриръм, тънки устни, ниско разположени дисморфични ушни миди, широка основа на носа, изпъкнали фронтални тубери. Глава – по- изпъкнала дясна теменна кост. Дихателна система – ДЧ 30/мин.; нос - проходим, чисто везикуларно дишане. ССС – СЧ 110 /мин, ясни тонове. Орофаринкс - спокоен. Език – розов. Корем мек неболезнен с трансверзална колостома, черен дроб се палпира на 2 см. под ребрената дъга по медиоклавикуларна линия, слезка не се палпира. Полова и отделителна системи – ректовагинална фистула, атрезия на ануса. ОДС – правилно развита, нервна система (НС) – нормален неврологичен статус за възрастта, без данни за менинго-радикулярно дразнене.

6.1.2.2 Резултат от микрочиповия анализ

При микрочиповата СГХ е идентифицирана терминална делеция в дългото рамо на 10-та хромозома – del(10)(q26.12q26.3), с размер - 12,629,370 bp.

arr 10 q26.12q26.3(122,804,780-135,434,149)x1 (Табл. 6, Фиг. 12).



Фигура 12. Резултат от микрочиповия анализ на Пациент 52 – делеция в хромозома 10, del(10)(q26.12q26.3)

6.1.3 Пациент 46

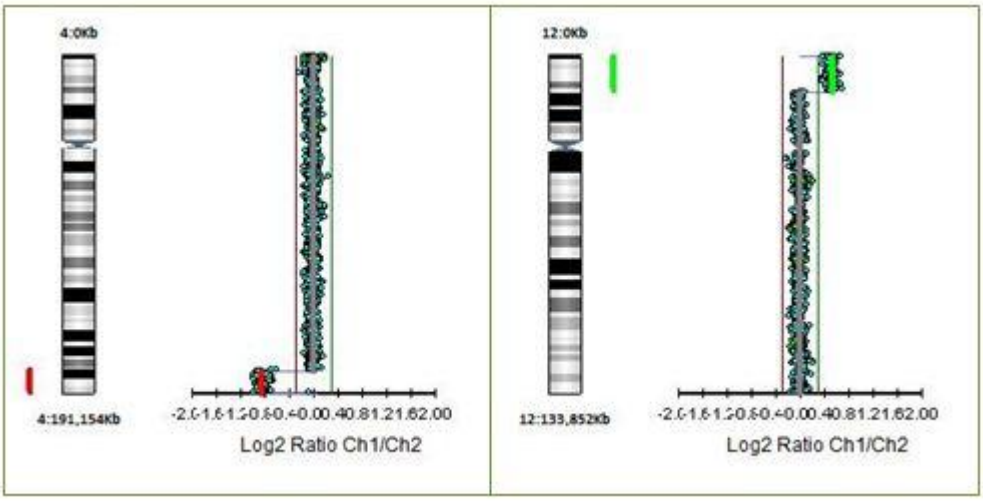
6.1.3.1 Клиничен фенотип

- **Анамнеза:** Дете от първа нормално протекла бременност, родено на термин с тегло 2700 гр., дължина 48 см. След раждането са установени малформативни стигми, мускулна хипотония, ларингеален стридор и парализа на гласните връзки. На 2 мес възраст е поставена трахеостома, поради пареза на ларинкса и невъзможност за екстубация. Познато на клиниката по генетика от едномесечна възраст. От направените изследвания: кариограма, вродени инфекции, ЕхоКГ, УЗ бъбреци, очни дъна – в норма; ТФЕ – двустранни субепендимни кисти, краниография – преждевременно синостозиране на фронталната част на сагиталния шев, КТ– лека дилатация на вентрикулите и субарахноидалнните пространства. От 4 год. възраст е с повишен апетит и затлъстяване. Много контактна, разбира и изпълнява поръчки. Работи с психолог и логопед с добър ефект.
- **Статус:** Тегло 34 кг (SDS = 1.71), ръст 123.5 см (SDS = -0.04), обиколка на глава 54.5 см (SDS = 2.22). Кожа с добър тургор и еластичност. ПМТ – изразена по торса. Долихоцефалия, лицев дисморфизъм: продълговато лице с битемпорално стеснение, изгладени супраорбитални дъги, антимонголоидни очни цепки, хипертелоризъм, диспластични ушни миди, микростомия, високо небце. ДС: ДЧ 18/мин, везикуларно дишане, трахеостома. ССС: СЧ 89 /мин, АН 100/60 mmHg. Корем над нивото на гръдния кош, меко- еластичен, неболезнен,без органомегалия. Леко понижен мускулен тонус, дивергентен страбизъм. Подчертана лумбална лордоза.

6.1.3.2 Резултати от микрочиповия анализ

Резултатите от микрочиповата СГХ при пациент 46 показват наличие на терминална делеция в дългото рамо на 4-та хромозома – del(4)(q34.3q35.2) с размер 12,682,687 bp. Открива се и терминална дупликация в късото рамо на 12-та хромозома – dup(12)(p13.33p13.1), обхващаща 13,881,527 bp.

arr 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1;12p13.33p13.1(230,451-14,111,977)x3 (Табл. 6, Фиг. 13).



Фигура 13. Резултат от микрочиповият анализ на Пациент 46 – делеция в хромозома 4 - del(4)(q34.3q35.2) и дупликация в хромозома 12 - dup(12)(p13.33p13.1).

6.1.4 Пациент 41

6.1.4.1 Клиничен фенотип

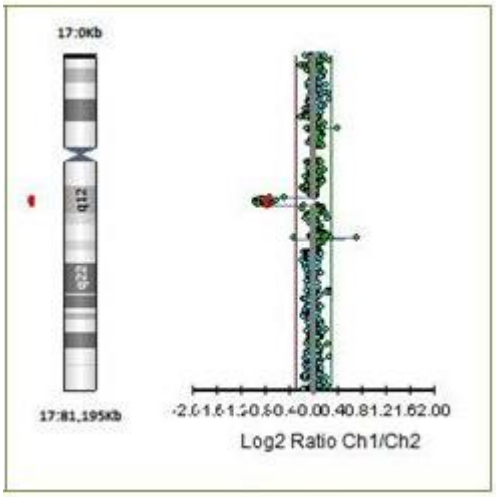
- **Анамнеза**: Момче на 3 г. 9 мес. от втора патологично протекла бременност. Поради катар на горни дихателни пътища (КГДП) майката приемала антибиотик в 8 л.м. Раждане преминали по естествен механизъм. Тегло на новороденото - 3200 г и дължина – 53 см. Детето е със забавено невро-психично развитие (НПР): задържа главичка на 7 мес, седи от 9 м., проходило на 3 год. 1 мес. Оперирано по повод на ингвинална херния на 3-месечна възраст. На 1 годишна възраст поради изоставане в НПР детето е хоспитализирано в Клиника по неврология и от изследванията: КК, трансаминази, кр. захар, ЕМГ – в норма. По-късно на фона на фебрилитет, хрема, кашлица и диария детето прави 3 генерализирани клонично-тонични гърчове (ГКТГ). Прието е в Инфекциозна болница МБАЛ Хасково. Лекувано за вирусен енцефалит. Направената КТ е в норма. На 2 г. възраст ехографски са установени две кисти в левия бъбрек. По време на предходната хоспитализация са измерени горногранични стойности на кр. захар (6.1; 6.6 mmol/l); ЕЕГ с умерено изразено изоставане в съзряването на коровата електрогенеза, без пароксизмална абнормност. Казва отделни думи. Посещава дневен център.
- **Статус**: Тегло 15 кг (SDS = − 0.7), ръст 97 см (SDS = − 0,9), обиколка на глава 52 см (SDS = 1.2). Кожа – бледо-мургава, хемангиом 0,8x0,5 см. на лява долна челюст, запазени тургор и еластичност. ПМТ – нормално представена. ПЛВ – не се палпират увеличени. Фациес – дисморфичен, продълговато лице, ретрогнатия, птоза на десен клепач, микрофталмия вдясно, две напречни браздички под долната устна. Глава – с

долихоцефална конфигурация и запазена подвижност. ДС: ДЧ 20/мин., нос – полупроходим, без секреция; дишане – везикуларно двустранно, без хрипове. ССС: СЧ 102/мин, ясни тонове, без шумова находка. Език – влажен, необложен. Орофаринкс – стичащ се секрет по задна фарингеална стена. Корем на нивото на гръдния кош, мекоеластичен, неболезнен, постоперативен цикатрикс ингвинално вдясно, черен дроб на 1 см. под ребрената дъга, слезка не се палпира увеличена. Полова и отделителна системи – крипторхизъм в дясно. ОДС – торакална сколиоза, издължен гръден кош, pes varus, абнормни дерматоглифи на дясна ръка, pectus excavatum. Леко понижен мускулен тонус.

6.1.4.2 Резултати от микрочиповия анализ

Проведената микрочипова СГХ показва интерстициална делеция в дългото рамо на 17-та хромозома. Делецията del(17)(q12) обхваща 1,798,455 bp.

arr 17q12(34,450,435-36,248,889)x1 (Табл. 6, Фиг. 14).



Фигура 14. Резултат от микрочиповия анализ на Пациент 41 – делеция в хромозома 17 - del(17)(q12).

6.1.5 Пациент 35

6.1.5.1 Клиничен фенотип

- **Анамнеза:** Дете от втора бременност, по време на която от ранен БХС е установен повишен риск за синдром на Edwards. В пети лунарен месец е установена ехографски аортна стеноза и по този повод в 24 г.с. е направена амниоцентеза – липсват данни от ДНК-анализа за тризомии 13, 18 и 21. В 25 г.с. майката е хоспитализирана в

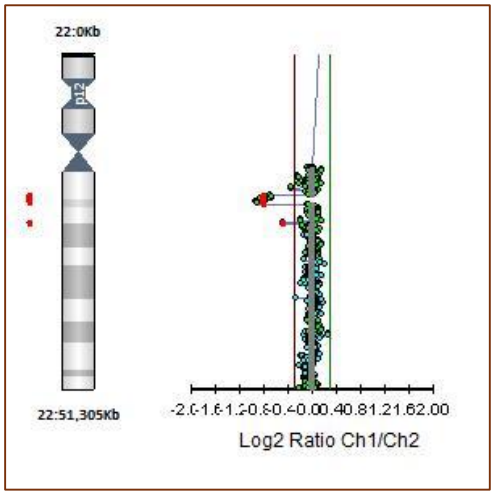
СБАЛАГ „Майчин дом” със съмнение за изтичане на околоплодни води. След този период е регистрирано изоставане в растежа на плода. Раждането е настъпило 12 дни преди термин чрез цезарово сечение, с тегло 1900 грама, дължина 44 см, обиколка на главата 33 см, APGAR 1' – 6, на 5' - 6. На едномесечна възраст е направена консултация, и е потвърдена лекостепенна клапна аортна стеноза. Детето е насочено към клиниката по генетика поради налични малформативни стигми. От направените при предишните хоспитализации изследвания: кариограма, ТФЕ, ехография на коремни органи, Са, Р – норма. Клетъчен и хуморален имунитет − леко понижени по процент общи Т лимфоцити при запазено имунобиологично равновесие между основните им субпопулации, В лимфоцити и НК клетки в референтни граници. Често боледуващо дете. Следи се от детски кардиолог във връзка с лекостепенна до умерена аортна стеноза.

- **Статус:** Тегло 8.360 кг (SDS= -2.75), дължина 72 см (SDS= -2.67), обиколка на глава 45,5 см (SDS= -1.68). Кожа – розова, със запазени тургор и еластичност. ПМТ – умерено представена. Фациес – дисморфичен с микроретрогнатия, тънка горна устна, преаурикуларни израстъци, коси очни цепки, хипертелоризъм, епикант, диспластични ушни миди. Тригоноцефалия. ДС: ДЧ 23/мин., нос полупроходим с жълтеникав серозен секрет, везикуларно дишане, хрипове не се аускултират. ССС: СЧ 93/мин, ясни тонове, ПМС 3/6 ст. на основата, ритмична сърдечна дейност. Корем над нивото на гръдния кош, меко-еластичен, раздут, черен дроб на 2 см под дъга, слезка не се палпира. Полова и отделителна системи – б.о. ОДС – петопръстна клинодактилия.

6.1.5.2 Резултати от микрочиповия анализ

Чрез микрочиповият анализ при Пациент 35 е открита интерстициална делеция в дългото рамо на 22-ра хромозома. Делецията del(22)(q11.21q11.22) обхваща 1,343,548 bp.

arr 22q11.21q11.22(21,561,492-22,905,039)x1 (Табл. 6, Фиг. 15).



Фигура 15. Резултат от микрочиповият анализ на пациент 35 – делеция в хромозома 22 - del(22)(q11.21q11.22).

6.1.6 Пациент 30

6.1.6.1 Клиничен фенотип

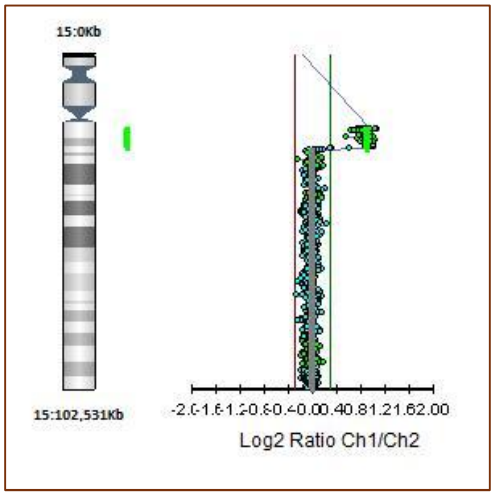
- **Анамнеза:** Момче на 5 г от първа патологично протекла бременност, с контракции през V-VIм.л., родено чрез секцио, с тегло 3550 гр., дължина 53 см., обиколка на главата 35 см. Регистрирани проблеми в храненето, понижен мускулен тонус, по-изразен за аксиална мускулатура, бързо изчерпващ се сукателен рефлекс. Поради изоставане в НПР за първи път е хоспитализиран на 1г.3м. Rö-графия на череп фас и профил: частична краниостеноза. Седи без подкрепа от 1г.3м, проходил след 2г.6м., не говори. Ежемесечно боледува от инфекции на ГДП. Изморява се лесно като ходи на по-дълги разстояние. Според майката отделя много голямо количество урина. След консултация с психиатър е изказано становище, че детето е с особености в поведението, характерни за аутистичния спектър.

- **Статус**: Тегло 18 кг (SDS=-0,68), ръст 116 см (SDS= 1,1), обиколка на глава 53 см. (SDS= 1,52). Кожа - бледо розова, запазени тургор и еластичност. ПМТ – редуцирана. Плагиоцефалия, лицева асиметрия (Л<Д), промивиращ филтрум, енофталм, антимонголоидни очни цепки, ниско поставени ушни миди. ДС: ДЧ 18 /мин., нос-проходим, везикуларно дишане двустранно, без добавени хрипове. ССС: ритмичен пулс, ясни тонове, СЧ 99/мин. Орофаринкс - спокоен. Език – влажен, необложен. Корем - на нивото на гръдния кош, без органомегалия.. Полова система – завършен десцензус на тестисите, отделителна система – б.о. ОДС- pectus excavatum, ставен хиперфлексибилитет, леко понижен мускулен тонус.

6.1.6.2 Резултати от микрочиповия анализ

Проведеният микрочипов анализ показва наличие на интерстициална дупликация в дългото рамо на 15-та хромозома – dup(15)(q11.2q13.1) с размер 6,264,831 bp.

arr 15q11.2q13.1(22,765,658-29,030,488)x3 (Табл. 6, Фиг. 16).



Фигура 16. Резултат от микрочиповият анализ на пациент 30 – дупликация нв хромозома 15 - dup(15)(q11.2q13.1)

6.1.7 Пациент 24

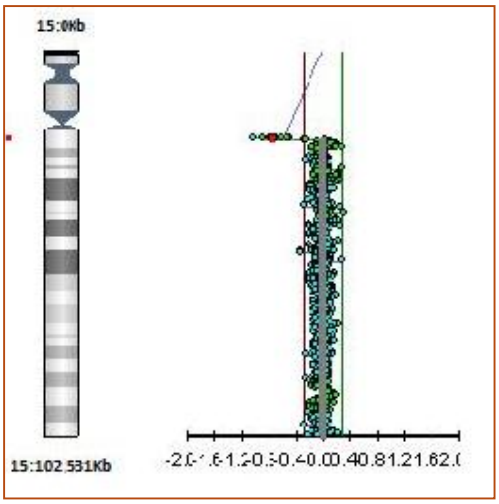
6.1.7.1 Клиничен фенотип

- Анамнеза и статус: пациентът е дете със синдром на вродени аномалии, лицев дисморфизъм изразяващ се в хипертелоризъм, страбизъм, ретрогнатия, разстройство от аутистичният спектър, изоставане в невропсихичното и психомоторното развитие, и ИН, хипотония. Не разполагаме с повече анамнестични данни.

6.1.7.2 Резултати от микрочиповия анализ

Проведеният микрочипов анализ показва наличие на делеция в дългото рамо на 15-та хромозома – del(15)(q11.2) с размер 494,828 bp.

arr 15q11.2(22,765,658-23,260,485)x1 (табл. 6, фиг.17)



Фигура 17. Резултат от микрочиповият анализ на пациент 24 – делеция в хромозома 15 - del(15)(q11.2).

6.2 Нормални вариации в броя копия и вариации в броя копия с неясно клинично значение

Освен патологични вариации, са открити нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение, наброяващи 239 вариации (средно по 2,9 вариации на пациент от общата група изследвани). Вариациите са разпределени върху 74 пациенти.

Размерите на всички установени нормални и неясни варианти варират по размер от 106,847 bp до 1,348,283 bp. От общия брой (239 - без патологичните) установени CNVs, 179 (74,9%) са с размер 100 - 500 Kb, 52 (21,8%) - с размер 500 Kb - 1 Mb и 8 (3,3%) - с размер над 1 Mb. От тях 141 са делеции и 98 дупликации.

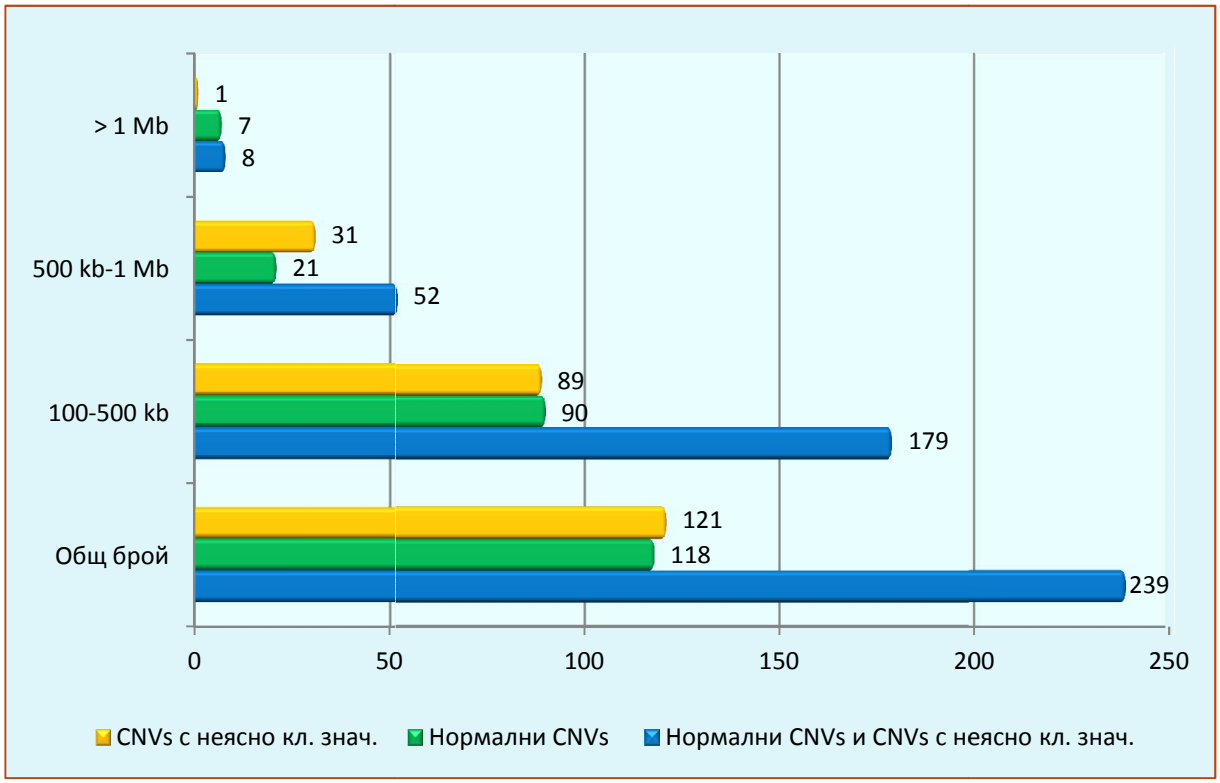
С нормална природа са 118. Те са разпределени по размер както следва: 90 (76,3%) с размер 100 - 500 Kb; 21 (17,8%) с размер 500 Kb - 1 Mb; 7 (5,9%) с размер над 1 Mb. От тях 27 са дупликации и 91 делеции.

Вариантите с неясно клинично значение наброяват 121, със следното разпределение по размер: 89 (73,5%) с размер 100-500 Kb; 31 (25,6%) с размер 500 Kb-1 Mb; 1 (0,8%) с размер над 1 Mb (Табл. 8).

Таблица 8. Брой и размери на установените нормални CNVs и CNVs неясно клинично значение

видове CNVs	Общ брой	100-500 kb	500 kb - 1Mb	>1 Mb
Нормални и CNVs с неясно кл. знач.	239	179	52	8
Нормални CNVs	118	90	21	7
CNVs с неясно кл. знач.	121	89	31	1

CNVs (без патологичните) са доказани при 91,4% (74 пациенти) от изследваната група. При 70 лица, размерите на CNVs варират от 100 - 500 Kb; при 39 лица, CNVs са в границите 500 Kb - 1 Mb; при 7 лица са открити CNVs с размери над 1 Mb. Броят на пациентите надхвърля 81, тъй като при голяма част от изследваните се открива комбинация от нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение. На Фигура 18 е показано разпределението по размери на нормалните CNVs и CNVs с неясно клинично значение.



Фигура 18. Разпределение по размери на нормалните CNVs и CNVs с неясно клинично значение.

7 Обсъждане

Обсъждането на резултатите от микрочиповия ДНК анализ може схематично и опростено да бъде представено както следва от фигура 19.

Фигура 19. Схематично представяне на алгоритъм за анализ на резултати от микричипов анализ.

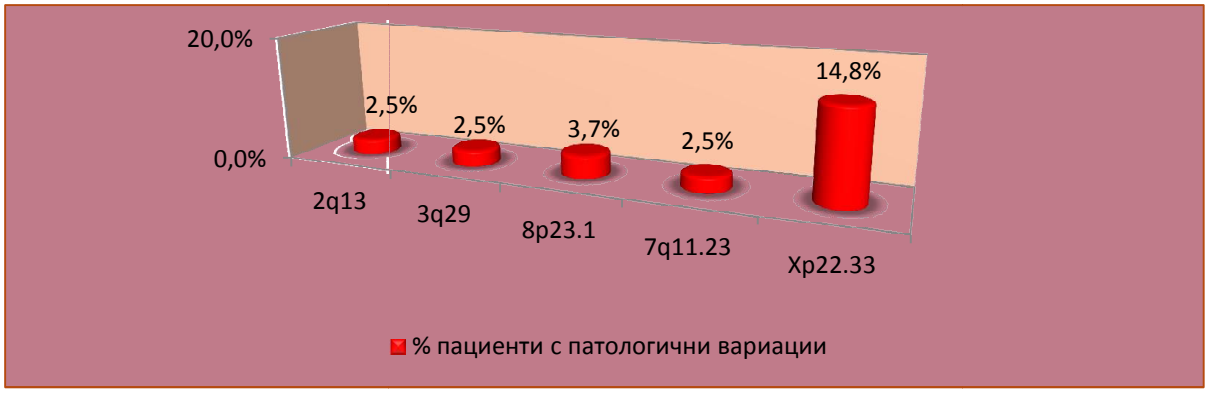
Анализът и обсъждането на установените от софтуерната програма варианти премина през задълбочено проучване, като в последствие беше обособена и нова група, на „вероятно нормални варианти"

7.1 Обсъждане на установените патологични CNVs в търсене на генотип-фенотипни корелации.

При 31 пациенти бяха открити общо 41 патологични вариации. При 7 от тези пациенти са открити 9 патологични аберации, които се асоциират със съответния фенотип. Интерпретацията на останалите варианти беше направена въз основа на: честотата в изследваната група, размера на вариацията, съдържанието на гени в съответния регион и типа на вариацията (делеция или дупликация), като някои от тях претърпяха прекласифициране.

Варианти с популационна честота между 1% и 3% се приемат като полиморфни (нормални). След прецизно анализиране на резултатите получени от софтуерната програма установихме, че от патологичните вариации, 5 типа – намиращи се в хромозомни локуси 2q13, 3q29, 8p23.1, 7q11.23, Xp22.33 (общо 24 вариации) – се срещат при по-голям процент (над 1,2%) от пациентите. Високите им честоти ни дадоха основание да предположим, че въпреки патологичната им природа, тези вариации се нуждаят от допълнителни анализи, поради което към момента биват прекласифицирани

като варианти с неясно клинично значение с възможно преминаване след бъдещи изследвания и поради високата им честота, към групата на „вероятно нормални варианти", които обособяваме по-надолу в анализа. В нашето изследване с честота по-висока от 1,2 % бяха открити патологични вариации в следните хромозомни локуси: 2q13 (2,5%), 3q29 (2,5%), 7q11.23 (3,7%), 8p23.1 (8,6%) и Xp22.33 (18,5%), изобразени на (Фиг. 20).



Фигура 20. Патологични вариации, установени при над 1,2% от пациентите.

За нямащи отношение към болестния фенотип, приехме 4 патологични варианта, които бяха с твърде малък размер и не съдържаха OMIM гени. Друг критерий, въз основа на който се направи интерпретацията, е типа на вариацията. Делеция, съдържаща OMIM гени е по-вероятно да бъде патологична. Следователно тези аберации могат да бъдат прекатегоризирани като вероятно нормални.

При други 4-ма пациенти от групата от 31 пациента с патологични вариации, бяха открити 4 геномни аберации, които по своята същност са патологични, но не са асоциирани с конкретния фенотип на пациентите. Тези 4 клинични случаи са описани както следва в текста и са прекласифицирани като варианти с неясно клинично значение след задълбочено обсъждане. Пациентите подлежат на клинично проследяване с цел проверка на генотип/фенотипните корелации, оценка на предиспозиция към социално-значими заболявания и евентуално прекласифициране.

7.1.1 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 44 - arr 7q31.2(115,099,099-116,966,889)x3

Микрочиповият ДНК анализ разкрива дупликация в хромозома 7 - dup(7)(q31.2), над 1Mb.

Дупликацията в 7q31.2 – района е патологична и обхваща **13 HGNC -** *(TFEC, TES, CAV2, CAV1, MET, CAPZA2, ST7-AS1, ST7, ST7-OT4, TPM3P1, ST7-AS2, MTND4P6, WNT2)* и **8 OMIM -** (*TFEC, TES, CAV2, CAV1, MET, CAPZA2, ST7, WNT2)* гена.

Пациентът е със синдром на вродени аномалии. След детайлна проверка на генотип-фенотипните корелации в този район в достъпните бази данни се установи липса на такава корелация при нашият пациент. Регионът е свързан основно с развитие на липодистрофия, хепатоцелуларен карцином, папиларен карцином на бъбреците, AUTS9.

7.1.2 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 50 – arr 8p23.2 (2,625,441-4,173,665)x3, 9q33.1 (120,022,793-121,547,117)x3

Микрочиповият анализ разкрива дупликация в хромозома 8 - dup(8)(q23.2) и в хромозома 9 - dup(9)(q33.1), s размер над 1Mb.

Дупликацията в 8p23.2 е патологична и обхваща **1 HGNC** (*CSMD1*) и **1 OMIM** (*CSMD1)*. При анализ на включения в аберацията ген се установи, че няма асоциирани заболявания с него.

Дупликацията в 9q33.1 е патологична и обхваща **2 HGNC** (*ASTN2, TLR4*) и **2 OMIM** (*ASTN2, TLR4)* гена. Асоциираните с тези гени заболявания са макулна дегенерация и колоректален карцином, които не могат да бъдат отнесени към клиничният фенотип на пациента. Въпреки, че е подозирана корова слепота и глухота, при изследване на очни дъна не са установени изменения, което не изключва появата им с течение на времето, което изисква проследяване.

7.1.3 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 2 – arr 16p11.2 (28,861,561-29,031,030)x3, 21q22.3 (48,067,895-48,090,288)x3

Микрочиповият ДНК анализ разкрива делеция в хромозома 16 - del(16)(p11.2) и дупликация в хромозома 21 - dup(21)(q22.3). И двете аберации са патологични.

Делецията в 16p11.2 обхваща **7 HGNC** ***(****SH2B1, ATP2A1, RABEP2, CD19, NFATC2IP, SPNS1, LAT*) и **6 OMIM** гена *(SH2B1, ATP2A1, RABEP2, CD19, SPNS1, LAT).*

Пациентът е със синдром на вродени аномалии. Въпреки, че делецията е с малки размери се обсъжда, тъй като районът се асоциира с 16p11.2 делеционен синдром с клиничен фенотип изразяващ се в лек лицев дисморфизъм, забавено развитие, рецидивиращи инфекции на ушите, хроничен максиларен синузит, имунен дефицит, Brody миопатия, когнитивни дефекти, аутизъм, епилепсия. Основният обсъждан кандидат ген свързан с аутизъм, когнитифен спад, епилепсия е *KCTD13* (potassium channel tetramerization domain containing-13) генът, който не е обхванат от аберацията на

пациента[293]. След справка с източници (DGV, OMIM, NCBI и др.) се установи, че функцията на останалите гени, не може да бъде свързана с конкретния фенотипа на пациент 2.

Дупликацията е патологична и обхваща **2 HGNC** *(PMRT2, DSTNP1)* **1 OMIM (***PMRT2)* ген. Дупликацията припокрива известен регион свързан с холопрозенцефалия, поради което се обсъжда. След проверка се установи, че свързаният със състоянието ген е *HPE1(holoprosencephaly 1*), не се обхваща от аберацията на пациента, при който такава симптоматика не се наблюдава. Съответно фенотипът не може да бъде отнесен към генното съдържание на аберацията.

7.1.4 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 53 – arr 3q26.32 (177,889,843-179,472,535)x2

Микрочиповият ДНК анализ разкрива делеция в хромозома 3 - del(3)(q26.32). Аберацията е над 1Mb. Делецията обхваща **14 HGNC** *(KCNMB2, KCNMB2-IT1, RN5S148, ZMAT3, PIK3CA, KCNMB3, LRRFIP1P1, ZNF639, MFN1, GNB4, ACTL6A, MRPL47, NDUFB5, USP13)* и **10 OMIM** *(KCNMB2, wildtype p53 inducted gene (ZMAT3), PIK3CA* **,** *MFN1, GNB4, ACTL6A, MRPL47, NDUFB5, USP13* гена. Асоциираните заболявания са рак на млечната жлеза, хепатоцелуларен, колоректален и гастроентестинален карцином, рак на яйчниците и белия дроб, кератоза. Изброените заболявания не се срещат при пациента, а посочените гени нямат отношение към синдромът на вродени аномалии, поради което не могат да бъдат описани генотип-фенотипни корелации.

- **Патологични находки в корелация с фенотипа**

7.1.5 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 79 - arr 2p16.3(50,982,143-51,314,401)x1; 5q35.2q35.3(175,470,501-177,136,261)x1

Микрочиповият ДНК анализ разкрива две делеции - в хромозома 2 - del(2)(p16.3) и в хромозома 5 - del(5)(q35.2q35.3).

Делецията в (2)(p16.3) региона е патологична и покрива 1 HGNC ген (*NRXN1*) и 1 OMIM ген (*NRXN1*). Обхванати са OMIM локуси, свързани с аутизъм.

Делецията в (5)(q35.2q35.3) региона е патологична и покрива **40 HGNC гена** (*FAM153B, C5orf25, KIAA1191, ARL10, MIR1271, NOP16, HIGD2A, CLTB, FAF2, RNF44, CDHR2, GPRIN1, SNCB, EIF4E1B, TSPAN17, UNC5A, HK3, UIMC1, ZNF346, ZNF346-IT1, FGFR4, NSD1, RAB24, MXD3, PRELID1, LMAN2, RGS14, SLC34A1, PFN3, F12, GRK6, PRR7, DBN1, PDLIM7, DOK3, DDX41, FAM193B, TMED9, B4GALT7, FAM153A*) и

24 OMIM гена (*NOP16, CLTB, GPRIN1, SNCB, UNC5A, HK3, UIMC1, ZNF346, FGFR4, NUCLEAR RECEPTOR-BINDING Su-var, ENHANCER OF ZESTE, AND TRITHORAX /(NSD1), RAB24, MXD3, PRELID1, LMAN2, RGS14, SOLUTE CARRIER FAMILY 34 (SODIUM/PHOSPHATE COTRANSPORTER), PFN3, COAGULATION FACTOR XII, GPRK6; DBN1, PDLIM7, DOK3, DDX41, B4GALT7*).

В посоченият хромозомен район на делецията (5)(q35.2q35.3) се намира *NSD1* генът. Смята се, че загуба на функционирането му е основна причина за поява на Sotos синдрома. Този синдромът се характеризира с лицев дисморфизъм - широко и високо чело, рядка коса във фронтотемпоралната област, дълго и тясно лице, издължена брадичка, долихоцефалия, когнитивен спад - ранно забавяне на развитието, лека до тежка интелектуална недостатъчност и свръхрастеж - темпорална и/или обиколка на главата с две или повече единици над средната стойност. Често са налице и поведенчески проблеми – хиперактивност, дефицит на вниманието, фобии, мании и натрапливости и импулсивно поведение, поради което е редно състоянието на пациента да бъде проследявано. Срещат се още проблеми с речта - заекване, монотонен глас и проблеми със звукоизвличането. Други признаци на синдрома на Sotos могат да включват сколиоза, припадъци, сърдечни или бъбречни дефекти, загуба на слуха, както и проблеми със зрението. Характерният лицев дисморфизъм е налице още при раждането, но става най-отчетлив между 1- и 6-годишна възраст. В 90% от случаите Sotos синдрома е разултат от мутации в *NSD1* гена. Описани са повече от 100 патологични варианта на този ген. Други генетични причини за момента не са установени[294]

NSD1 генът е локализиран в 5q35 хромозомния локус и включва 22 кодиращи екзона. Принадлежи към семейство гени за хроматин-модифициращи ензими. Протеинът, който кодира този ген е хистон-лизин N-метилтрансфераза. Хистон-метилтрансферазите са ензими, които модифицират хистоните, като ги метилират и така регулират активността им. *NSD1* протеинът контролира активността на гени, свързани с нормалния растеж и развитие, въпреки че голяма част от тези гени не са идентифицирани[295]

При тестване на 234 лица със Sotos синдром, се установява, че пациентите с *NSD1* аномалия, свързана с 5q35 микроделеция са с по-редки прояви на свръхрастеж, но имат по-тежка интелектуална недостатъчност в сравнение с тези с вътрегенни патологични варианти.

При този синдром са идентифицирани над 380 мутации в гена *NSD1*. В японското население е докладвана микроделеция от 1.9 Mb на хромозома 5, обхващаща *NSD1* при индивиди със синдром на Sotos. Голяма част от микроделециите са генерирани чрез неалелна хомоложна рекомбинация между фланкиращи нископовторени последователности[296]. При други популации са по-чести мутациите в рамките на самия ген.

При проучване на Saugier-Veber и др. (2007) са идентифицирани 69 различни точкови мутации, включително 48 нови мутации, в гена *NSD1* в 104 пациенти от 102 семейства със синдром на Sotos. Точкови мутации са открити в 80%, големи делеции водещи до липса на гена *NSD1* - в 14%, а вътрегенни пренареждания в 6%. Големите делеции варирали от 1 до 4.5 Mb. Пациентите с нонсенс мутации водещи ди скъсен, нефункционален протеин са били с по-тежък фенотип, отколкото тези с друг тип мутация на гена. При 12 пациенти с клиничен фенотип на синдром на Sotos не са били идентифицирани мутации в този ген[297]. Намаленото количество на *NSD1* протеина уврежда нормалната дейност на гени, участващи в растежа и развитието. Въпреки това, не е ясно как точно недостигът на този протеин по време на развитието води до свръхрастеж, когнитивен дефицит и други симптоми. Описани са и случаи на Beckwith-Wiedemann синдром (свръх растеж и повишен риск от неоплазии) с мутация в този ген.

7.1.6 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 52 - arr 10q26.12q26.3(122,804,780-135,434,149)x1

Микрочиповият ДНК-анализ разкрива делеция в хромозома 10 – del(10)(q26.12q26.3). Делецията е патологична и покрива **85 HGNC гена** (*FGFR2, RPS15AP5, ATE1, NSMCE4A, TACC2, BTBD16, PLEKHA1, ARMS2, HTRA1, DMBT1, C10orf120, CUZD1, FAM24B, FAM24A, C10orf88, PSTK, IKZF5, ACADSB, HMX3, HMX2, BUB3, GPR26, CPXM2, CHST15, OAT, NKX1-2, LHPP, RPS10P18, FAM53B, METTL10, FAM175B, ZRANB1, CTBP2, RPS27P18, C10orf122, ALDOAP2, C10orf137, MMP21, UROS, BCCIP, DHX32, FANK1, ADAM12, C10orf90, DOCK1, FAM196A, NPS, FOXI2, CLRN3, PTPRE, MKI67, MGMT, EBF3, CTAGE7P, GLRX3, TCERG1L, PPP2R2D, BNIP3, JAKMIP3, DPYSL4, STK32C, LRRC27, PWWP2B, C10orf91, INPP5A, NKX6-2, C10orf93, GPR123, KNDC1, UTF1, VENTX, MIR202, ADAM8, TUBGCP2, ZNF511, CALY, PRAP1, C10orf125, ECHS1, PAOX, MTG1, SPRN, CYP2E1, SYCE1, SPRNP1*) и **49 OMIM гена** (*FGFR2, ATE1, NSMCE4A, TACC2, PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN-CONTAINING PROTEIN, FAMILY A, MEMBER 1, ARMS2, HTRA1, DMBT1, PSTK, IKZF5, HMX3, HMX2,*

BUDDING UNINHIBITED BY BENZIMIDAZOLES 3, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, GPR26, CHST15, OAT, FAM175B, ZRANB1, CTBP2, MMP21, UROS, BCCIP, DHX32, FANK1, ADAM12, DOCK1, NEUROPEPTIDE S, PTPRE, MKI67, EBF3, GLRX3, PPP2R2D, BNIP3, C10ORF39, INPP5A, NKX6-2, GPR123, UTF1, VENTX2, ADAM8, DRD1IP, PRAP1, ECHS1, SPRN, CYP2E1, SYCE1).

Съществуването на 10q-делеционият синдром е описано още през 1989г. по-рано от Wulfsberg и сътр, които демонстрират 18 случая на пациенти с терминална делеция на дългото рамо на хромозома 10[298]. Според този и други източници фенотипните прояви са многобройни и включват нисък ръст, лицев дисморфизъм - микроцефалия, долохоцефалия, триангуларна форма на лицето, проминиращ корен на носа с форма на клюн, дълъг филтрум, малка заострена челюст и страбизъм. Срещат се също клинодактилия, ограничена екстензия на лакътната става и крипторхизъм. Описани са случаи с хиперкинеза и агресивно поведение, редукция на вниманието, и намалена нужда от сън. Често е постналталното забавяне на растежа и развитието, интелектуална недостатъчност, хипотония при новородените, затруднения в храненето, сърдечни дефекти и дефекти на пикочо-половата система. Това е рядко хромозомно разстройство, като повечето терминални делеции започват в хромозомни локуси 10q25 или 10q26. Все още се изучават конкретните функции на гените в тези региони. Тъй като размерът на делецията може да варира, са правени проучвания за съпоставяне на размера с тежестта на фенотипа или доминиращата симптоматика. При едно пручване са сравнени фенотипните характеристики на изследваните пациенти с други докладвани с изолирани делеции и се стигнало до предположението, че малките 10q26.2 терминални делеции са свързани с изоставане в растежа и развитието или интелектуална недостатъчност, черепно-лицев дисморфизъм и аномалии на външните гениталии. По-големите по размер терминални делеции в райони 10q26.12 или 10q26.13 са сметнати за отговорни за развитие на аномалии на бъбреците / пикочните пътища. Предполага се, че хаплоинсуфициенция на един или няколко гена, разположени в района 10q26.12-q26.13 може да допринесе за патогенезата на тези дефекти и се подчертава значението на *FGFR2* (fibroblast growth factor receptor 2) и вероятно на *CTBP2* (C-terminal-binding protein 2) като кандидат гени[299]. Генът *FGFR2* кодира синтезирането на протеин, наречен рецептор за фибробластен растежен фактор 2. Този протеин е един от четирите рецептора за фибробластен растежен фактор, имащи важна роля в процеси като клетъчното делене, регулацията на клетъчния растеж и зреене, образуване на кръвоносните съдове, заздравяване на рани и ембрионалното развитие.

Вторият ген е *CTBP2*, който кодира два различни протеина. Единият регулира експресията на други гени, а вторият е компонент на синапсите в нервната система.

Поради наличието на повтарящ се фенотип свързан с поведението и адаптацията на тези пациентите, много проучвания са насочени и към ракриване на кандидат гени отговорни за тези състояния. В едно от тях е разгледан пациент с хиперактивност, при наличие на малка терминална 10q26 делеция, в чиято област се намират 4 възможни кандидат гени за поведенчески проблеми. Първият е отново *CTBP2,* вторият ген е *ADRB1* (адренергичен рецептор), който кодира протеин, медииращ физиологичните ефекти на адреналина и норадреналина и може да се асоциира със сърдечна недостатъчност. *DPYSL4* (Dihydropyrimidinase-related protein 4) е третият ген и се смята, че е свързан с диференциация на невроните, а *DRD1IP* (dopamine receptor D1- interacting protein / CALY - calcyon neuron specific vesicular protein) генът кодира протеин взаимодействащ с D1 допаминовите рецептори и други подтипове. Има роля в процеси медииращи паметта и обучението[300].

7.1.7 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 46 - arr 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1; 12p13.33p13.1(230,451-14,111,977)x3

Микрочиповият ДНК-анализ разкрива делеция в хромозома 4 – del(4)(q34.3q35.2) и дупликация в хромозома 12 – dup(12)(p13.33p13.1).

Делецията е патологична и покрива **49 HGNC гена** (*NEIL3, AGA, LINC00290, ODZ3, MIR1305, DCTD, FAM92A3, C4orf38, WWC2, CLDN22, CLDN24, CDKN2AIP, ING2, RWDD4, C4orf41, STOX2, ENPP6, IRF2, CASP3, CCDC111, MLF1IP, ACSL1, HELT, SLC25A4, KIAA1430, SNX25, LRP2BP, ANKRD37, UFSP2, C4orf47, CCDC110, PDLIM3, SORBS2, TLR3, FAM149A, ORAOV1P1, CYP4V2, KLKB1, F11, SLC25A5P6, MTNR1A, FAT1, MRPS36P2, ZFP42, TRIML2, TRIML1, HSP90AA4P, FRG1, MLLT10P2*) и **21 OMIM гена** (*NEIL3, AGA, ODZ3, DCTD, ING2, C4ORF41, IRF2, CASP3, MLF1IP, ACSL1, SOLUTE CARRIER FAMILY 25, UFSP2, CANCER/TESTIS ANTIGEN KM-HN-1, PDLIM3, TLR3, CYTOCHROME P450, FAMILY 4, SUBFAMILY V, POLYPEPTIDE 2, KLKB1, F11, MTNR1A, FAT1, FRG1*).

Дупликацията е патологична и покрива **226 HGNC гена** (*IQSEC3, SLC6A12, SLC6A13, KDM5A, CCDC77, B4GALNT3, NINJ2, WNK1, RAD52, ERC1, WNT5B, FBXL14, ADIPOR2, CACNA2D4, LRTM2, DCP1B, CACNA1C, CACNA1C-IT1, CACNA1C-IT2,*

CACNA1C-AS4, CACNA1C-IT3, CACNA1C-AS3, CACNA1C-AS2, CACNA1C-AS1, CBX3P4, FKBP4, ITFG2, NRIP2, FOXM1, C12orf32, TULP3, TEAD4, TSPAN9, TSPAN9-IT1, PRMT8, EFCAB4B, PARP11, CCND2, C12orf5, FGF23, FGF6, C12orf4, RAD51AP1, DYRK4, NDUFA9, AKAP3, GALNT8, KCNA6, KCNA1, KCNA5, NTF3, ANO2, VWF, CD9, PLEKHG6, TNFRSF1A, SCNN1A, LTBR, CD27, TAPBPL, VAMP1, MRPL51, NCAPD2, SCARNA10, GAPDH, IFFO1, NOP2, CHD4, SCARNA11, LPAR5, ACRBP, ING4, ZNF384, C12orf53, COPS7A, MLF2, PTMS, LAG3, CD4, GPR162, LEPREL2, GNB3, CDCA3, USP5, TPI1, SPSB2, RPL13P5, LRRC23, DSTNP2, ENO2, ATN1, C12orf57, RNU7-1, PTPN6, MIR200C, MIR141, PHB2, SCARNA12, EMG1, LPCAT3, C1S, C1R, C1RL, RBP5, CLSTN3, PEX5, ACSM4, CD163L1, CD163, GAPDHP31, APOBEC1, GDF3, DPPA3, CLEC4C, NANOGNB, NECAP1, NANOG, SLC2A14, NANOGP1, SLC2A3, FOXJ2, C3AR1, CLEC4A, POU5F1P3, ZNF705A, FAM66C, FAM90A1, ALG1L2, FAM86FP, CLEC6A, CLEC4D, CLEC4E, AICDA, MFAP5, RIMKLB, RPSAP51, A2ML1-AS1, A2ML1-AS2, A2ML1, PHC1, M6PR, KLRG1, C12orf33, A2M, PZP, A2MP1, DDX12P, KLRB1, GOT2P3, CLEC2D, NPM1P5, CLECL1, CD69, KLRF1, CLEC2B, KLRF2, CLEC2A, CLEC12A, CLEC1B, CLEC12B, CLEC9A, CLEC1A, CLEC7A, OLR1, C12orf59, GABARAPL1, KLRD1, KLRK1, KLRC4, KLRC3, KLRC2, KLRC1, MAGOHB, STYK1, CSDA, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R9, PRR4, TAS2R10, PRH1, TAS2R12, TAS2R13, PRH2, TAS2R14, TAS2R15, TAS2R50, TAS2R20, TAS2R19, TAS2R31, TAS2R63P, TAS2R46, TAS2R64P, TAS2R43, TAS2R30, TAS2R18, TAS2R42, PRB3, PRB4, PRB1, PRB2, HIGD1AP8, RNU7-60P, ETV6, BCL2L14, LRP6, MANSC1, LOH12CR2, LOH12CR1, DUSP16, CREBL2, GPR19, CDKN1B, APOLD1, MIR613, DDX47, GPRC5A, MIR614, GPRC5D, HEBP1, HTR7P1, KIAA1467, GSG1, EMP1, C12orf36, GRIN2B) и **156 OMIM гена** (*IQSEC3, SOLUTE CARRIER FAMILY 6, KDM5A, B4GALNT3, NINJ2, WNK1, RAD52, RAB6IP2, WNT5B, FBXL14, ADIPOR2, CACNA2D4, DCP1B, CACNA1C, FKBP4, FOXM1, TULP3, TEAD4, TSPAN9, PRMT8, EFCAB4B, CCND2, TP53-INDUCED GLYCOLYSIS AND APOPTOSIS REGULATOR, FGF23, FGF6, RAD51AP1, DYRK4, NDUFA9, AKAP3, UDP-N-ACETYL-ALPHA-D-GALACTOSAMINE:POLYPEPTIDE N-ACETYLGALACTOSAMINYLTRANSFERASE, POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SHAKER-RELATED SUBFAMILY, MEMBER; POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SHAKER-RELATED SUBFAMILY, MEMBER; POTASSIUM CHANNEL, VOLTAGE-GATED, SHAKER-RELATED SUBFAMILY, MEMBER; NTF3, ANO2, VWF, CD9, PLECKSTRIN HOMOLOGY DOMAIN-CONTAINING PROTEIN, FAMILY G, MEMBER 6, TNFRSF1A, SCNN1A, LTBR, TNFRSF7, TAPBPL, VAMP1, MRPL51, GAPDH, HOM-TES-103 GENE, NOL1, CHD4,*

LPAR5, ACRBP, ING4, ZNF384, MLF2, PTMS, LAG3, CD4, LEPREL2, GNB3, CDCA3, USP5, TPI1, SPSB2, ENO2, ATN1, PTPN6, PHB2, MBOAT5, C1S, C1RL, RBP5, CLSTN3, PEX5, CD163L1, CD163, APOBEC1, GDF3, DPPA3, CLEC4C, NECAP1, NANOG, SOLUTE CARRIER FAMILY 2 (FACILITATED GLUCOSE TRANSPORTER), MEMBER; SOLUTE CARRIER FAMILY 2 (FACILITATED GLUCOSE TRANSPORTER), MEMBER; C3AR1, CLEC4A, FAM90A1, CLEC6A, CLEC4D, CLEC4E, AICDA, MFAP5, RIMKLB, A2ML1, PHC1, M6PR, KLRG1, A2M, PZP, KLRB1, DENDRITIC CELL-ASSOCIATED LECTIN 1, CD69, KLRF1, CLEC2B, CLEC2A, CLEC12A, CLEC1B, CLEC9A, CLEC1A, CLEC7A, OLR1, GABARAPL1, KLRD1, KLRK1, KLRC4, KLRC2, KLRC3, KLRC2, KLRC2, KLRC1, STYK1, CSDA, TAS2R7, TAS2R8, TAS2R9, PROL4, TAS2R10, PRH1, TAS2R13, PRH2, TAS2R14, TAS2R50, TAS2R20, TAS2R19, TAS2R36, TAS2R46, TAS2R43, TAS2R30, TAS2R42, PRB3, PRB4, PRB1, PRB2, ETV6, BCLG, LRP6, DUSP16, CREBL2, GPR19, CDKN1B, APOLD1, RAI3, HEBP1, EMP1, GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, N-METHYL-D-ASPARTATE, SUBUNIT 2B).

Състояния свързани с описаната делеция са: аспартилглюкозаминурия; прогресивна външна офталмоплегия, фамилна хипертрофична кардиомиопатия, повишен риск от развитие на херпес симплекс енцефалит, макулна дегенерация, корнеоретинална дистрофия прекаликреинов дефицит, дефицит на фактор XI. Асоциирана е и форма на наследствена моторна и сензорна невропатия (HMSN) HMSN I, представляваща по своята същност демиелинизираща невропатия.

Състояния свързани с идентифицираната дупликация са : псевдохипоалдостеронизъм тип II, наследствена сензорна и автономната невропатия тип IIA (HSAN2A) , папиларен тироиден карцином, конусна дистрофия на ретината тип 4, Тимъти синдром, Brugada синдром 3, туморна хиперфосфатемична калциноза, автозомно-доминантен хипофосфатемичен рахит, епизодична атаксия тип 1, предсърдно мъждене, болест на фон Вилебранд, тип 1, 2, 3; фамилна периодична треска, есенциална хипертония, недостатъчност на фактори на комплемента C1s, Зелуегър синдром, адренолевкодистрофия, Refsum болест (Хередопатия атактика полиневритиформис), Klippel-Feil синдром 3, микрофталмия, колобома, хиперимуноглобулинемия IgM тип 2 болест на Алцхаймер, алфа-2-макроглобулинна недостатъчност, аспергилоза, остра миелоидна левкемия; хронична еозинофилия, автозомно-доминантна исхемична болест на сърцето, множествена ендокринна неоплазия тип IV, интелектуална недостатъчност и др.

Голяма част от изброените заболявания се манифестират на по-късен етап от живота, което показва колко е важно своевременното и правилно диагностициране и определяне на рисковете с цел профилактика и превенция на усложненията, както и за целите на адекватна медико-генетична консултация и евентуална пренатална диагностика за бъдещите бременности в семейството.

Наличието на терминални аберации насочва към фамилни преустройства, но поради липса на биологични проби от родителите, не беше възможно изследване на произхода на аберациите. В случай на наследственост на транслокацията фенотипната изява е резултат от небалансирана сегрегация тип adjacent 1 по време на първото мейотично делене. В нашия случай интерпретацията на кариотипа беше допълнително затрудена от еднаквия размер на транслоцираните сегменти.

7.1.8 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 41 - arr 17q12(34,450,435-36,248,889)x1

Микрочиповият ДНК-анализ разкрива делеция в хромозома 17 – del(17)(q12q12). Делецията е патологична и покрива **24 HGNC гена** (*TBC1D3B, CCL3L3, CCL4L1, TBC1D3C, TBC1D3H, CCL3L1, CCL4L2, TBC1D3G, ZNHIT3, MYO19, PIGW, GGNBP2, DHRS11, MRM1, LHX1, AATF, ACACA, HMGB1P24, C17orf78, TADA2A, DUSP14, SYNRG, DDX52, HNF1B*) и **24 OMIM гена** (*TBC1D3B, CCL3L1, CCL3L3, CCL4L2, CCL4L1, TBC1D3C, TBC1D3H, CCL3L1, CCL3L3, CCL4L2, CCL4L1, TBC1D3, TBC1D3G, ZNHIT3, PIGW, GGNBP2, AATF, ACACA, TADA2A, DUSP14, ADAPTOR-RELATED PROTEIN COMPLEX 1 GAMMA SUBUNIT-BINDING PROTEIN 1; DDX52, HNF1B*).

Делецията в 17q12 региона е свързана с бъбречни кисти, диабетен синдром, забавяне на развитието, аутизъм и шизофрения, припадъци и по-рядко срещани фенотипове с дисморфични характеристики, преходна неонатална хиперкалцемия, Мюлерова аплазия и вродена диафрагмална херния.

Бъбречни кисти и диабет - Bellanne-Chantelot и др. (2005) изследват 40 пациенти с клиничен фенотип съответстващ на диабет тип MODY5 и наличие на бъбречни кисти. Открити са изменения на гена *TCF2(HNF1B)* в 70% от случаите. Точкови мутации са били идентифицирани при 18 пациенти, а при 10 са идентифицирани големи структурни пренареждания, при 9 от които, делециите са били с размер най-малко 1.2 Mb, покриващи *TCF2* и *TRIP3* гените както и други 7.

Изследователите наблюдавали подобен фенотип при пациентите с точкови мутации и тези с големи делеции. Описани са и различни аномалии на половите пътища в 80% от пациентите с *TCF2* мутации. Bellanne-Chantelot и колеги заключават, че големи геномни пренареждания включващи *TCF2* гена могат да причинят MODY5 и че делециите са най-честата молекулярна промяна свързана с тези пациенти[301]. До подобни заключения стигат и Mefford и колеги. (2007)г[302].

Nagamani и сътрудници (2010) изследват 9 пациенти с геномни пренареждания в района 17q12. При 4 от тях е идентифицирана с делеция, а при 5 дупликация. Болните с делеция, са били в първите 2 десетилетия от живота си, а клиничната им картина включвала кистозно бъбречно заболяване, поликистозна бъбречна дисплазия, бъбречна агенезия; нефункционален десен бъбрек, краен стадий на хронична бъбречна недостатъчност след бъбречна трансплантация. Всички 4 пациенти са били с нисък ръст, трима са показвали признаци на засягане на централната нервна система (забавена реч, интелектуална недостатъчност, комплексни парциални припадъци). Делециите обхващали минимум 1.06 Mb, простиращи се от *LHX1* до *LOC28400* гена[303].

Мюлерова аплазия / дисгенезия и асоциираните разстройства – в няколко проучвания се разкрива връзката на 17q12 делецията Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser (MRKH) синдром, развиващ се у жени с нормален кариотип и включва засягане на репродуктивната система. Може да се наблюдават скелетни аномалии, сърдечни и бъбречни дефекти, глухота и др. такива случаи са описани от Cheroki и сътр. (2008)[304] и Бернардини и сътр. (2009)[305].

Разстройства от аутистичния спектър и шизофрения - По литературни данни от различни изследвания, 17q12 микроделеционният синдром често е асоцииран с нервни или психични разстройства. Moreno-De-Luca и сътр. (2010) в своето проучване заключват, че тази аберация е патологичен рекурентен вариант в броя копия в генома, който обуславя повишен риск от развитие на разстройство от аутистичния спектър и шизофрения, и че един или повече от 15 гени от делетираният район е дозо-зависим и е от съществено значение за нормалното развитие на мозъка[306]. Сред тези 15 гена е *HNF1B*, за когото се смята, че е свързан с риска от поява на невропсихични разстройства. Пациенти с делеция на *HNF1B* гена са диагностицирани и с бъбречни нарушения и то рядко в комбинация с невропсихични разстройства. Установено е че при пациенти с делеция на *HNF1B* гена се идентифицира и 17q12 делеция. Оказва се, че водят до развитие на идентично заболяване. Невропсихичните разстройства при 17q12

делецията се проявяват в по-лека степен, при водещ симптом на бъбречно нарушение[307.]

7.1.9 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 35 - arr 22q11.21q11.22(21,561,492-22,905,039)x1

Микрочиповият ДНК-анализ разкрива делеция в хромозома 22 – del(22)(q11.21q11.22). Делецията е патологична и покрива **68 HGNC гена** *(GGT2, POM121L8P, BCRP6, LINC00281, PPP1R26P5, RIMBP3B, HIC2, TMEM191C, PI4KAP2, RIMBP3C, UBE2L3, YDJC, CCDC116, SDF2L1, PPIL2, MIR301B, MIR130B, YPEL1, MAPK1, PPM1F, TOP3B, PRAMEL, IGLVI-70, IGLV4-69, IGLVI-68, IGLV10-67, IGLVIV-66-1, IGLVV-66, IGLVIV-65, IGLVIV-64, IGLVI-63, IGLV1-62, IGLV8-61, FAM108A6P, IGLV4-60, SOCS2P2, IGLVIV-59, IGLVV-58, BMP6P1, IGLV6-57, IGLVI-56, IGLV11-55, IGLV10-54, IGLVIV-53, TOP3B2, VPREB1, IGLV5-52, IGLV1-51, IGLV1-50, IGLV9-49, IGLV5-48, IGLV1-47, IGLV7-46, IGLV5-45, IGLV1-44, IGLV7-43, IGLVI-42, IGLVVII-41-1, IGLV1-41, IGLV1-40, ASH2LP1, IGLVI-38, IGLV5-37, IGLV1-36, IGLV7-35, ZNF280B, ZNF280A, PRAME*) и **12 OMIM гена** *(GGT2, RIMBP3B, HIC2, RIMBP3C, UBE2L3, SDF2L1, PPIL2, YPEL1, MAPK1, TOP3B, VPREB1, PRAME).*

Честотата на 22q11.2 делеционният синдром варира от 1 на 4000 до 1 на 6395 засегнати. Проявява се с различни признаци и симптоми, които могат да засегнат почти всяка част от тялото. Характеристиките на този синдром се различават значително, дори и сред засегнатите членове на едно семейство. Честите симптоми са сърдечни аномалии (74% от болните), често налице от самото раждане, цепка на небцето и устата, характерен фациес(70-90%). Пациентите със този синдром често страдат от рецидивиращи инфекции, поради имунен дефицит(77%), автоимунни заболявания като ревматоиден артрит и болест на Грейвс. Засегнатите лица могат да имат аномалии на дихателната и бъбречната системи(37%), хипокалциемия (което може да доведе до припадъци - 50%), тромбоцитопения, трудности при хранене, стомашно-чревни проблеми, както и загуба на слуха. Възможни са и скелетни аномалии, включително нисък ръст и по-рядко, аномалии на гръбначния стълб. Много деца с 22q11.2 делеционен синдром имат забавяне в развитието, когнитивен дефицит, риск от развитие на психични заболявания като шизофрения, тревожност и афективни разстройства. Склонни са към хиперактивност с дефицит на вниманието и разстройства от аутистичния спектър. Поради хетерогенността на клиничната картина, различните симптоми често са били описвани в рамките на различни нозологични единици.

Синдромът е наричан още: синдром на DiGeorge, велокардиофациален синдром, автозомно-доминантно форма на синдром на Opitz G / BBB, синдром на Shprintzen, CATCH22 синдром, Cayler кардиофациален синдром, Седлакова синдром, конотрункалнолицев синдром и др. След идентифициране на генетичната основа на тези заболявания, е установено, че всички те са част от един синдром с много възможни признаци и симптоми. За да се избегне объркване, състоянието обикновено се нарича 22q11.2 микроделеционен синдром., описан на базата на основната си генетична причина.

Повече от 85% от болните имат микроделеция в 22q11.2 локуса с размер около 3 Mb. В делетирания район се съдържат около 30-40 гена, някои от които не са добре проучени. Предполага се, че делецията на *TBX1,* е причина за по-голямата част от симптомите (сърдечните дефекти, цепките на небцето, лицевия дисморфизъм, загубата на слух и хипокалциемията). Хемизиготността по друг ген *COMT* в същия регион има отношение към поведенческите проблеми и умственото изоставане. За разнообразието от клинични симптоми имат значение и много други гени. Делецията на DGCR се проявява като автозомно-доминантна мутация. При 93% от случаите става въпрос за де ново мутация[308,309.]

Mikhail и сътр. (2014) изследвали 13 пациенти с различни по размер делеции в описания район, възникващи най-често де ново. Шест от случаите били с аберация с размер - 1.1Mb и заположена между LCR22-D и -E, с фенотип, в съответствие с по-рано докладвани случаи на синдрома. Трима пациенти имали делеция с размер 1.8Mb – от LCR22-D до –F, с подобен фенотип. При четирима размерът на делецията е бил 700-KB -от LCR22-E до -F ,с по-лек фенотип – без забавяне в растежа и сърдечно-съдови дефекти. Независимо от размера на делецията, всички показвали забавяне в развитието и интелектуална недостатъчност. Вродени сърдечно-съдови дефекти са били наблюдавани при 56% от пациентите с по-големи микроделеции, включени преградни дефекти, отворен дуктус артериозус, аномалии на аортна клапа, и сърдечна декстроротация. Авторите предлагат категоризиране на терминалните 22q11.2 микроделеции в 3 патологични геномни типа[310].

7.1.10 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 30 - arr 15q11.2q13.1(22,765,658-29,030,488)x3

Микрочиповият ДНК-анализ разкрива дупликация в хромозома 15 – dup(15)(q11.2q13.1). Дупликацията е патологична и покрива **111 HGNC гена** (*ELMO2P1, TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, WHAMMP3, GOLGA8IP, HERC2P2,*

HERC2P7, GOLGA8E, MKRN3, MAGEL2, NDN, C15orf2, SNRPN, SNURF, SNHG14, SNORD107, SNORD64, SNORD108, SNORD109A, SNORD116-1, SNORD116-2, SNORD116-3, SNORD116-4, SNORD116-5, SNORD116-6, SNORD116-7, SNORD116-8, SNORD116-9, SNORD116-10, SNORD116-11, SNORD116-12, SNORD116-13, SNORD116-14, SNORD116-15, SNORD116-16, SNORD116-17, SNORD116-18, SNORD116-19, SNORD116-20, SNORD116-21, SNORD116-22, SNORD116-23, SNORD116-24, SNORD116-25, SNORD116-26, SNORD116-27, SNORD116-28, SNORD116-29, SNORD116-30, SNORD115-1, SNORD115-2, SNORD115-3, SNORD115-4, SNORD115-5, SNORD115-6, SNORD115-7, SNORD115-8, SNORD115-9, SNORD115-10, SNORD115-11, SNORD115-12, SNORD115-13, SNORD115-14, SNORD115-15, SNORD115-16, SNORD115-17, SNORD115-18, SNORD115-19, SNORD115-20, SNORD115-21, SNORD115-22, SNORD115-23, SNORD115-24, SNORD115-25, SNORD115-26, SNORD115-27, SNORD115-28, SNORD115-29, SNORD115-30, SNORD115-31, SNORD115-32, SNORD115-33, SNORD115-34, SNORD115-35, SNORD115-36, SNORD115-37, SNORD115-38, SNORD115-39, SNORD115-40, SNORD115-41, SNORD115-42, SNORD115-43, SNORD115-44, SNORD115-45, SNORD115-46, SNORD115-47, SNORD115-48, SNORD109B, UBE3A, ATP10A, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OCA2, HERC2, GOLGA8F, GOLGA8G, HERC2P9, WHAMMP2) и **16 OMIM гена** (*TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1, MKRN3, MAGEL2, NDN, C15ORF2, SNRPN, UBE3A, ATP10A, GABRB3, GABRA5, GABRG3, OCA2 GENE, HERC2*).

15q11q13 хромозомната област е известна със своята нестабилност и е силно податлива на клинично значими геномни пренареждания. Дупликациите в този район и свързаните заболявания са причинени от присъствието на най-малко едно допълнително майчино копие на Прадер-Вили / Ейнджълман критичния район (PWACR) Допълнителното копие или копия най-често възникват по един от двата механизма: майчина изодицентрична свръхбройна хромозома - idic (15) - в 80% от случаите и майчина интерстициална дупликация на района – 20% от случаите. Големите пренареждания на тези позиции са отговорни за 15q11-q13 дупликационния синдром. Клиничните характеристиките включват хипотония и моторни закъснения, интелектуална недостатъчност, разстройство от аутистичния спектър, епилепсия, и инфантилни спазми. Рядко са наблюдавани психоза или внезапна необяснима смърт. Случаите с майчина idic (15), обикновено са с по-тежка клиника от тези, с интерстициална дупликация. The PWACR е импринтиран, като дупликациите

възникнали в майчиното копие обуславят 15q11-q13 дупликационния синдром, докато бащински дупликации са свързани с променлив фенотип. Докладвани са новородени със затруднения в храненето[311]. Честотата на синдрома е 1 на 30 000 новородени, като съотношението между двата пола е почти 1:1[312].

Според Tan и сътр. с развитието на ЦНС са свързани най-малко три гена - *NIPA1, NIPA2, CYFIP1*, намиращи се в този регион. Дупликация на *SNRPN* гена, получено от майката, е асоциирано с аутизъм. Други свързани с развитието на нервната система и поява на неврологичните разстройства са *GABRA5, GABRA3, GABRG3, MAGEL2, MKRN3, NDN*, *SNRPN* и *UBE3A,* като първите три от тях кодират субединици на GABA–рецептори, медииращи основния невротрансмитер с инхибиторни функции в мозъка – GABA[313]. *HERC2* е друг важен ген кодиращ Е3 убиквитин лигаза. Индивидите с аберации обхващащи този ген могат да имат интелектуална недостатъчност[314] или тежка форма на синдром на Ейнджълман[315].

7.1.11 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 24 - arr 15q11.2(22,765,658-23,260,485)x1

Микрочиповият ДНК анализ разкрива делеция в хромозома 15 - del(15)(q11.2). Аберацията е под 1Mb и обхваща **5 HGNC** (*ELMO2P1, TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1)* и **4 OMIM (***TUBGCP5, CYFIP1, NIPA2, NIPA1)* гена. Според някои автори спада към редките микроделеционни синдроми описани в последните няколко години, като посоченият тук се характеризира с ИН, забавена реч, поведенчески проблеми, припадъци и разстройство от аутистичният спектър, срещани в голямата си част и при нашия пациент. Делецията е свързана с посочените гени, които не са подложени на импринтиране. Районът е асоцииран и с АД спастична параплегия. Според някои автори продуктът на гена *CYFIP1* взаимодейства с малък GTPase RAC1 бектък, който има роля в развитието и възстановяването на невронните структури[316]. Както беше споменато и при предишния пациент, гените *NIPA1, NIPA2* имат роля в развитието на нервната система[313].

Резултатите от микрочиповия анализ при пациенти 52, 46 и 30, разкриват наличие на големи аберации, които обаче не са установени с рутинен цитогенетичен метод. Тези случаи илюстрират, че само цитогенетичният анализ използван самостоятелно понякога не е достатъчен, за да се определят хромозомни аберации, дори когато са с големи размери.

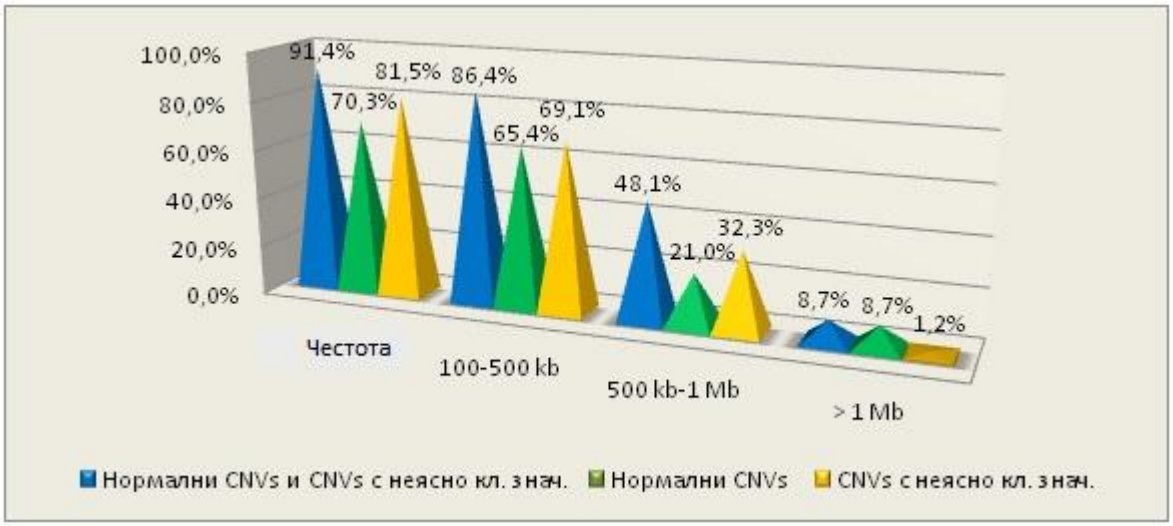
7.2 Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение

Правилната интерпретацията на вариантите в броя копия е тясно свързана с данните от популационни проучвания на честотата на структурните варианти. Поради недостатъчните към момента познания в областта клиничната интерпретация и откриването на генотип-фенотипни корелации се оказва трудно. Според много автори CNVs, са от голямо еволюционно значение и играят важна роля във формирането на генетични различия в рамките на популацията. Някои от вариантите е известно, че са свързани и с генетично болести с традиционно унаследяване[317,318], или се свързват с конкретни предипозиции към такива. Смята се също, че CNVs определят повече от половината вариации в човешкият геном. Именно затова, идентифицирането и правилното анализиране на вариантите в броя копията в генома е от голямо значение за разкриване на значението на нововъзникналите варианти и последващото им категоризиране след подробно сравняване с наличните в базите данни. Ще се подпомогне и асоциирането на някои CNVs със чести и социално значими мултифакторни заболявания[319,320].

Навлизането на микрочиповите технологии като метод на избор за скриниране на човешкия геном осигори разкриването на голям брой аберации от различен тип. В настоящото изследване при молекулното кариотипиране на 81 пациенти с вродени нарушения в развитието, са установени нормални вариации в броя копия при 58 пациенти и вариации с неясно клинично значение при 66 пациенти, като броят на лицата надхвърля 81, тъй като при повечето пациенти се установяват повече от една аберация. Общият брой идентифицирани нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение, наброява 239. От тях 141 са делеции, а 98 дупликации. Общият брой идентифицирани варианти, заедно с патологичните е 280, което прави средно по 3,5 CNVs на пациент.

Според някои източници човешкият геном съдържа средно по 12 CNVs за всеки индивид[70,71]. Други автори, като Itsara и сътр., установяват през 2009г. при анализа на 2500 контроли, между 3 и 7 варианта среден брой CNVs на човек. Те идентифицират наличие на CNVs > 100 Kb при 65-80% от изследваните, CNVs > 500 Kb при 5-10% и CNVs > 1 Mb при 1-2%[100].

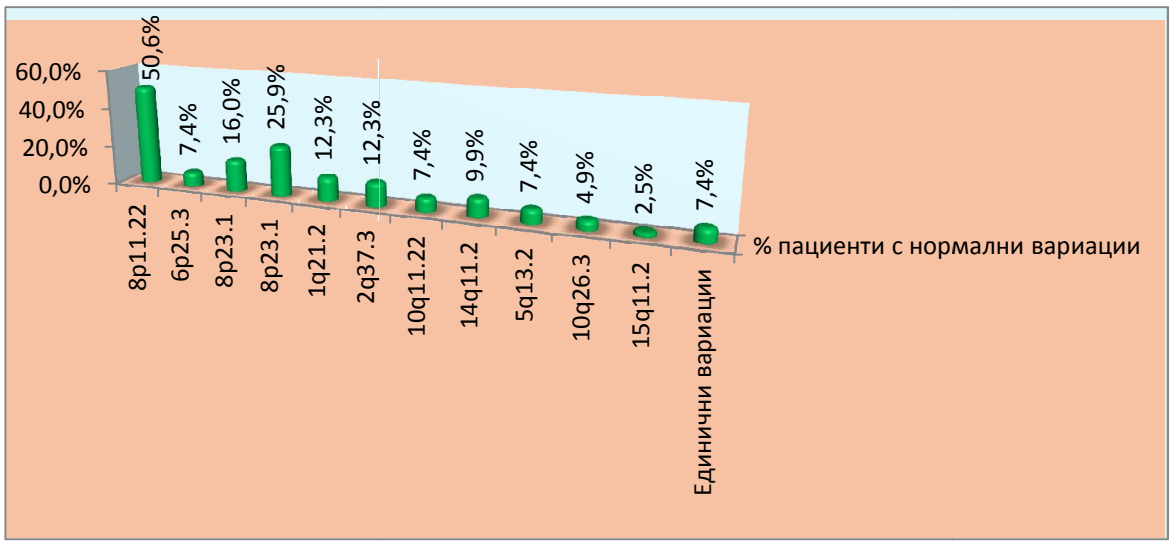
Нашите резултати идентифицират честоти на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение при изследваните лица както следва: CNVs с размер 100 kb – 500 kb са установени при 86,4% (70 пациенти), варианти с размер 500 Kb - 1 Mb - при 48,1% (39 пациенти) и CNVs с размер над 1 Mb - при 8,6% (7 пациенти) (Фиг. 21). Сумарно процентите надхвърлят 100, поради установяване при голямата част от пациентите на повече от една вариация с различни размери, като се забелязва и по-голяма честота на CNVs с размери между 100 и 500 kb.



Фигура 21. Честота на установените нормални вариации и вариации с неясно клинично значение в изследваната група, разпределени по размер.

7.2.1 Нормални вариации в броя копия

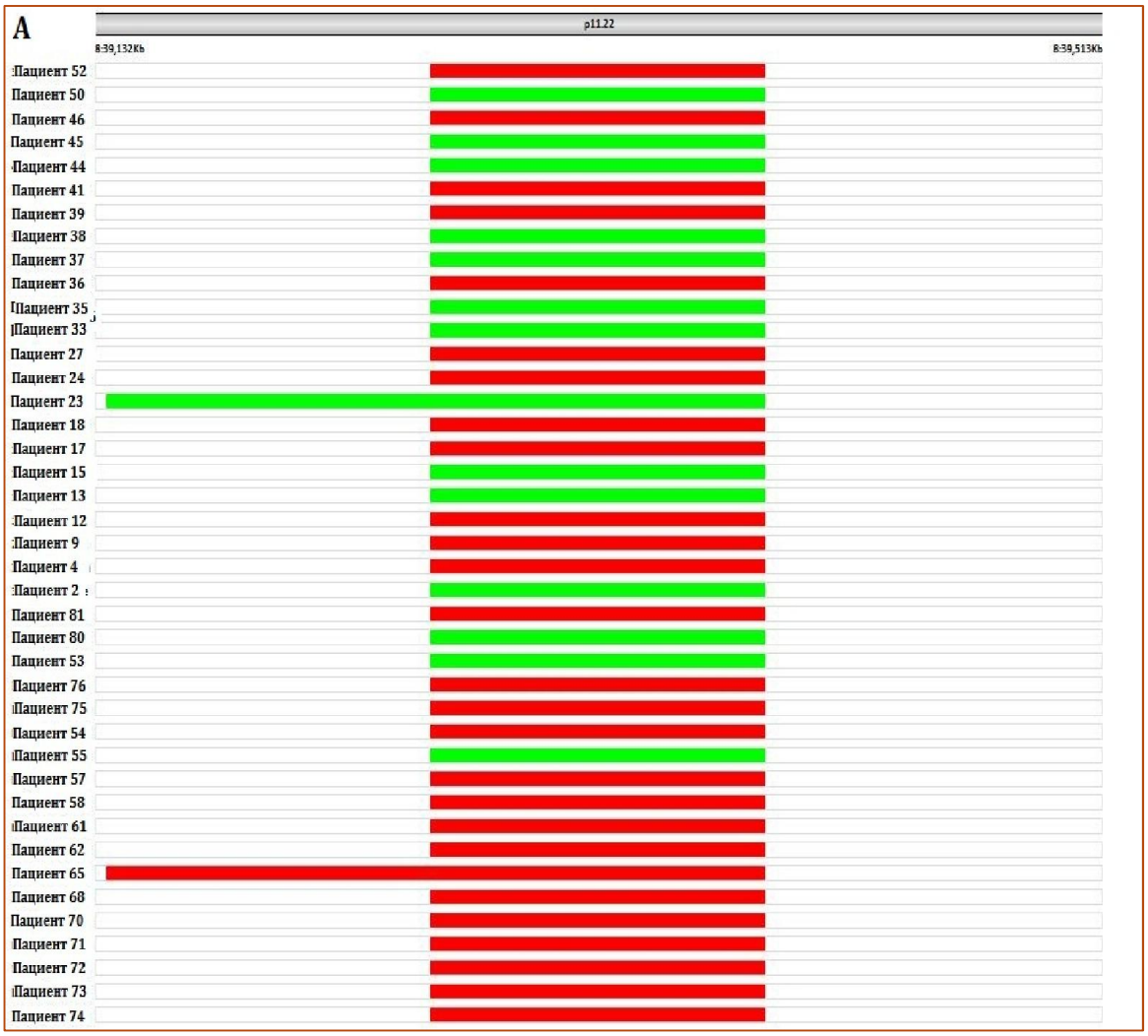
От общия брой (280), 118 намерени вариации са с нормална природа и се срещат при 58 от пациентите. При повече от един пациент са установени нормални вариации в следните цитогенетични локуси 8p11.22, 6p25.3, 1q21.2, 2q37.3, 10q11.22, 14q11.2, 5q13.2, 10q26.3, 15q11.2, 19q13.31 и две различни вариации в локуса 8p23.1. При 6 пациенти са намерени 6 единични вариации в локуси: 14q32.33, 10q11.22, 5p15.33, 16p13.11, 15q14, 14q21.2 (Фиг. 22).



Фигура 22. Честота на различните нормални CNVs в изследваната група.

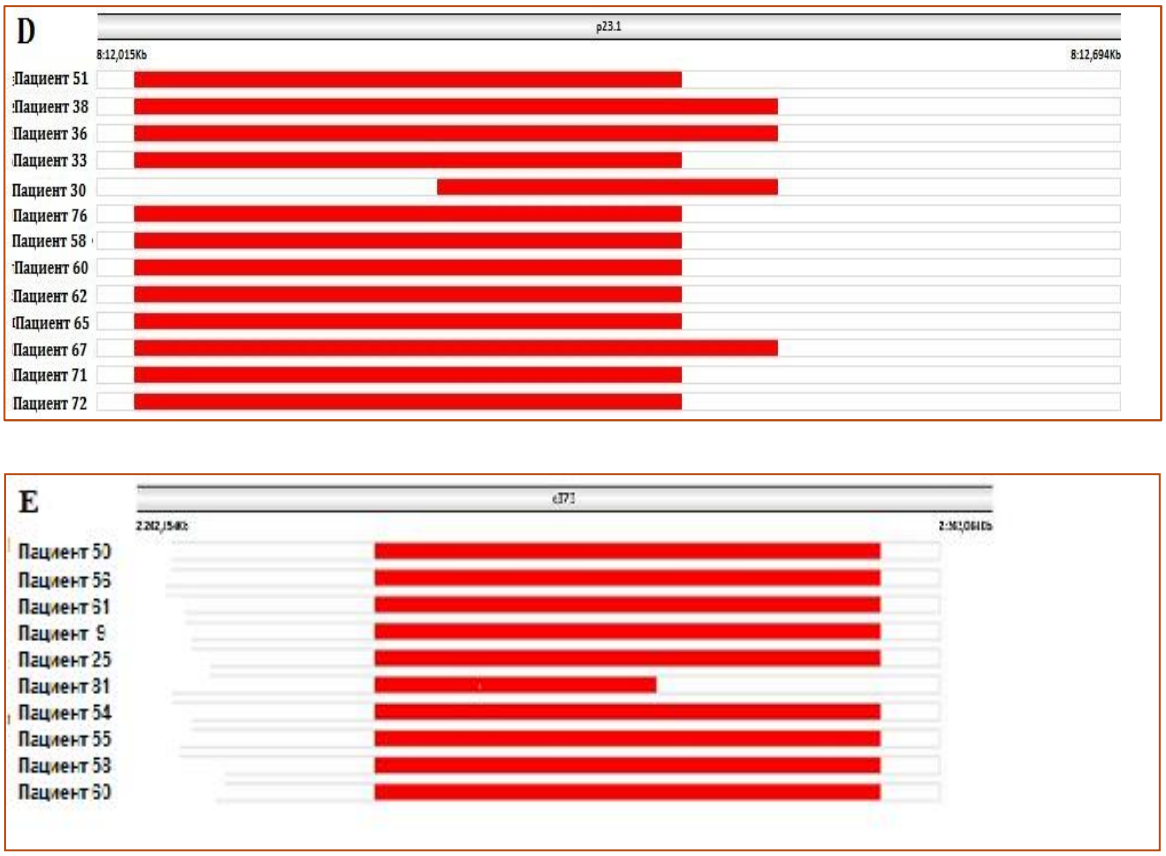
Най-честите нормални вариации в нашето проучване се срещат при над 10% от изследваните пациенти и са със следната локализация: 8p11.22, 1q21.2, 2q37.3 и две различни вариации в 8p23.1 локуса (Фиг. 23). Прави впечатление, че при част от изследваните се касае за делетиран материал, а при други за дуплициран, което показва, че тези райони са със значителна вариабилност. Необходимо е да се проведе геномно скриниране на по-голяма група пациенти, за да се установи реалната честота на откритите от нас единични нормални варианти.

Според някои автори полиморфните CNVs се смятат за част от естествените генетични разлики в популацията, докато редките биха могли да участват в етиологията на някои генетични болести[319] Мащабно популационно проучване ръководено от Wellcome Trust Consortium, разкрива, че най-вероятно полиморфните CNVs не са от етиологично значение за възникването на мултифакторни заболявания, а са по-скоро част от различията в генома на индивидите в популацията[320].


A
p11.22
8:39,132Kb
8:39,513Kb
Пациент 52
Пациент 50
Пациент 46
Пациент 45
Пациент 44
Пациент 41
Пациент 39
Пациент 38
Пациент 37
Пациент 36
Пациент 35
Пациент 33
Пациент 27
Пациент 24
Пациент 23
Пациент 18
Пациент 17
Пациент 15
Пациент 13
Пациент 12
Пациент 9
Пациент 4
Пациент 2
Пациент 81
Пациент 80
Пациент 53
Пациент 76
Пациент 75
Пациент 54
Пациент 55
Пациент 57
Пациент 58
Пациент 61
Пациент 62
Пациент 65
Пациент 68
Пациент 70
Пациент 71
Пациент 72
Пациент 73
Пациент 74

B
q21.2
1:148,483Kb
1:150,308Kb
Пациент 50
Пациент 48
Пациент 47
Пациент 33
Пациент 30
Пациент 14
Пациент 77
Пациент 57
Пациент 61
Пациент 70

C
p23.1
8:6,458Kb
8:8,891Kb
Пациент 51
Пациент 50
Пациент 37
Пациент 36
Пациент 33
Пациент 32
Пациент 31
Пациент 30
Пациент 29
Пациент 25
Пациент 23
Пациент 18
Пациент 17
Пациент 11
Пациент 7
Пациент 4
Пациент 1
Пациент 81
Пациент 79
Пациент 76
Пациент 58
Пациент 62
Пациент 65
Пациент 67
Пациент 68
Пациент 71
Пациент 72
Пациент 73



Фигура 23. Нормални вариации в броя копия, установени при над 10% от изследваните пациенти. A) 8p11.22; B) 8p23.1 (1); C) 8p23.1 (2); D) 1q21.2.; E) 2q37.3 Червените региони отговарят на делетиран генетичен материал, а зелените на дуплициран генетичен материал.

7.2.2 Вариации в броя копия с неясно клинично значение

Установените варианти с неясно клинично значение са 121, срещат се при 66 пациенти от изследваната група и са разпределени както следва по размер: 89 (73,6%) с размер 100-500 Kb; 31 (25,6%) с размер 500 Kb-1 Mb; 1 (0,8%) с размер над 1 Mb. От тях 50 бяха делеции и 71 дупликации.

За да бъдат интерпретирани коректно тези вариации е необходимо сравняване на резултатите с общодостъпни бази данни като DGV, UCSC, DECIPHER и др. Също така анализът може да се основава и на собствени бази данни с нормални CNVs, получени при валидирането на дадена микрочипова платформа, преди въвеждането й в рутинната практика.

В най-добрият случай валидирането се извършва върху група здрави индивиди. Не е изключено и използването на данни, получени след анализиране на резултати от пациенти, като се смята, че причината за възникването на генетичната болест най-вероятно е наличието на голяма патологична вариация, а установените по-малки по размер аберации е по-малко вероятно да имат отношение към заболяването[102].

От установените 121 вариации с неясно клинично значение при повече от един пациент се срещат вариации в следните цитогенетични локуси: 8p11.22, 8p23.1, 14q32.33, Xp22.33, 17q21.31, 16p11.2, 2q37.3, 14q11.2, 22q11.23, 11q25, 12p13.31, Xq22.3, 2p11.1. При 27 пациенти се намериха общо 33 срещани само при тях (единични) вариации.

В нашето изследване, при по-голям процент (над 1,2%) от пациентите, се срещат 13 типа вариации, (общо 88 вариации) с неясно клинично значение, което ни дава основание да предположим, че най-вероятно нямат патологична природа и могат да бъдат категоризирани като вероятно нормални, описани по-долу.

Тринадесет от вариациите, срещащи се в локуси 14q32.33, 16p11.2, 16p12.3, 17q21.31, 1q21.2, 20p12.1, 22q11.22, 2q37.3, 4q35.2, 8p23.1 се срещат при пациенти с идентифицирани големи патологични аберации, свързани със клиничната симптоматика. Съгласно споменатите вече изводите на някои изследователи (Lee и сътр.) свързани с размера на установената аберация, би могло да се приеме, че по-малките по размер допълнителни варианти нямат отношение към заболяването, при положение, че пациентите са с идентифицирана голяма и изяснена патологична находка[102]. Поради това приехме за възможно тези 13 варианта с неясно значение да нямат отношение към конкретния фенотип и могат да бъдат прекласифицирани към новата група на „вероятно нормални варианти".

При други 2 случаи след подробен анализ 2 варианта с неясно клинично значение бяха прекласифицирани като вариации с възможен патологичен характер, както следва.

При пациент 53 беше установена делеция в хромозома 17 - del(17)(q21.31). делецията е под 1Mb, обхваща 5 **HGNC** ***(****KIAA1267, LRRC37A, ARL17B, LRRC37A2, ARL17A)* и 1 **OMIM (***KIAA1267)* гена, но е свързана с Koolen de Vries синдром асоцииран с гена *KIAA1267.* Синдромът е с вариабилна клиника, но общите характеристики включват: ниско тегло, неонатална хипотония, лошо хранене в ранна детска възраст и оромоторна диспраксия, умерено забавяне на развитието, когнитивни нарушения, емпатично поведение. Сред симптоматиката са и епилепсия, сърдечни дефекти (ASD, VSD) и бъбречни / урологични аномалии. Депигментация на кичури коса са били описани няколко пациенти (DECIPHER). С възрастта се наблюдава загрубяването на чертите на лицето. За 17q21.3 микроделеционният синдром е съобщено, едновременно през 2006 г. от няколко независими групи. Koolen (2008) описва клиничните характеристики на синдрома, изследвайки 22 пациенти с 17q21.3

микроделеция, като оценява честота на синдрома като ~ 1 / 16,000.[321] Koolen (2012) и Дзолино (2012) установяват, че хаплоинсуфициенцията на гена *KANSL1* (регулатор на хроматинната модификация), е достатъчна за развитието на 17q21.31 микроделеционния синдром[322]. Поради това евентуалната патологична природа на аберацията не може да бъде отхвърлена въпреки определянето й от софтуерната програма като вариация с неясно клинично значение.

При друг случай - пациент 30, установената дупликация с неясно клинично значение в регион 1q21.2. съдържаше 15 HGNC гена (*TRNAQ37P, NBPF23, PFN1P12, TRNAE30P, TRNAN36P, RNU1-5, TRNAE29P, TRNAF17P, FCGR1C, MIR548U, HIST2H3PS2, FAM72C, PPIAL4C, TRNAF16P, TRNAG34P*) и 1 OMIM ген (*PPIAL4E*). Генът *NBPF23* принадлежи към семейство гени, характеризиращи се с тандемно повторени копия на DUF1220 протеинови домени. Вариациите в броя копия в хромозомния регион, с локализирани по-голям брой DUF1220 домените, са свързани с редица неврогенетични заболявания и проблеми в развитието. Сред тях са микроцефалия, макроцефалия, невробластома, аутизъм, шизофрения, интелектуална недостатъчност, вродени аномалии на бъбреците, пикочните пътища и сърцето[318]. Базирайки се на тази информация, не може да бъде отхвърлен потенциалният патологичен характер на вариацията в 1q21.2 региона.

Осемнадесет от останалите вариации с неясно клинично значение не могат да бъдат интерпретирани като вероятно нормални нито като патологични, тъй като са необходими допълнителни изследвания за изясняване на клиничното им значение.

7.3 Обсъждане на вероятно нормалните вариации в броя копия

Новосформираната група навероятно нормални вариации в броя копия в генома беше съставена от вариации с неясно клинично значение и патологични вариации, които бяха прекласифицирани след анализ.

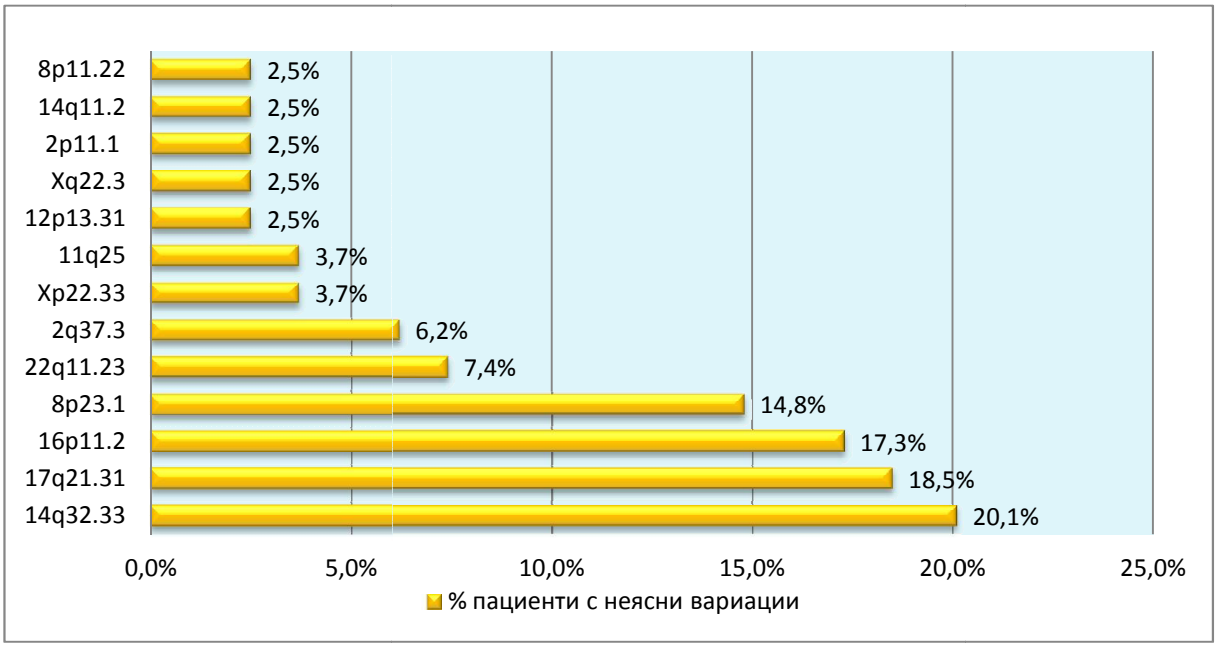
7.3.1 Вариации с неясно клинично значение

В нашето проучване се забелязва, че процентът на CNVs с неясно клинично значение е сравнително висок. Напълно възможно е част от тези варианти да са характерни и съответно нормални за българската популация и съответно да са рядко срещани или да не се срещат в проучените чужди популации. Генетична хетерогенност

на българският народ е добре известен факт, като съвременният генофонд е резултат от еволюционни промени в алелните честоти, настъпващи под влиянието на редица природни и демографски събития.

Вариациите с неясно клинично значение се интерпретират съобразено с техният размер, природата (делеции или дупликации) им, съдържанието на гени и честотата сред изследваните индивиди.

В нашето изследване, при по-голям процент (над 1,2%) от пациентите, се срещат 13 типа вариации, (общо 88 вариации) с неясно клинично значение в хромозомни локуси 8p11.22, 8p23.1, 14q32.33, Xp22.33, 17q21.31, 16p11.2, 2q37.3, 14q11.2, 22q11.23, 11q25, 12p13.31, Xq22.3, 2p11.1. Това дава основание да се предположи, че най-вероятно нямат патологична природа и могат да бъдат категоризирани като вероятно нормални (Фиг. 24).



Фигура 24. Вариации с неясно клинично значение, установени при над 1,2% от пациентите

Най-честите вероятно нормални вариации в проучването ни се срещат в локуси 14q32.33, 17q21.31 и 16p11.12, и са представени при над 15% от пациентите (Фиг. 25).

Фигура 25. Вариации с неясно клинично значение, установени при над 15% от пациентите. A) 14q32.33; B) 17q21.31; C) 16p11.2. Червените региони отговарят на делеции, зелените на дупликации.

Тринадесет от вариациите, срещащи се в локуси 14q32.33, 16p11.2, 16p12.3, 17q21.31, 1q21.2, 20p12.1, 22q11.22, 2q37.3, 4q35.2, 8p23.1 се срещат при пациенти с идентифицирани големи патологични аберации, свързани със клиничната симптоматика. Съгл. споменатите вече изводите на някои изследователи (Lee и сътр.) свързани с размера на установената аберация, би могло да се приеме, че по-малките по размер допълнителни варианти нямат отношение към заболяването, при положение, че пациентите са с идентифицирана голяма и изяснена патологична находка[102]. Поради

това приехме за възможно тези 13 варианта да нямат отношение към конкретния фенотип.

7.3.2 Патологични вариации

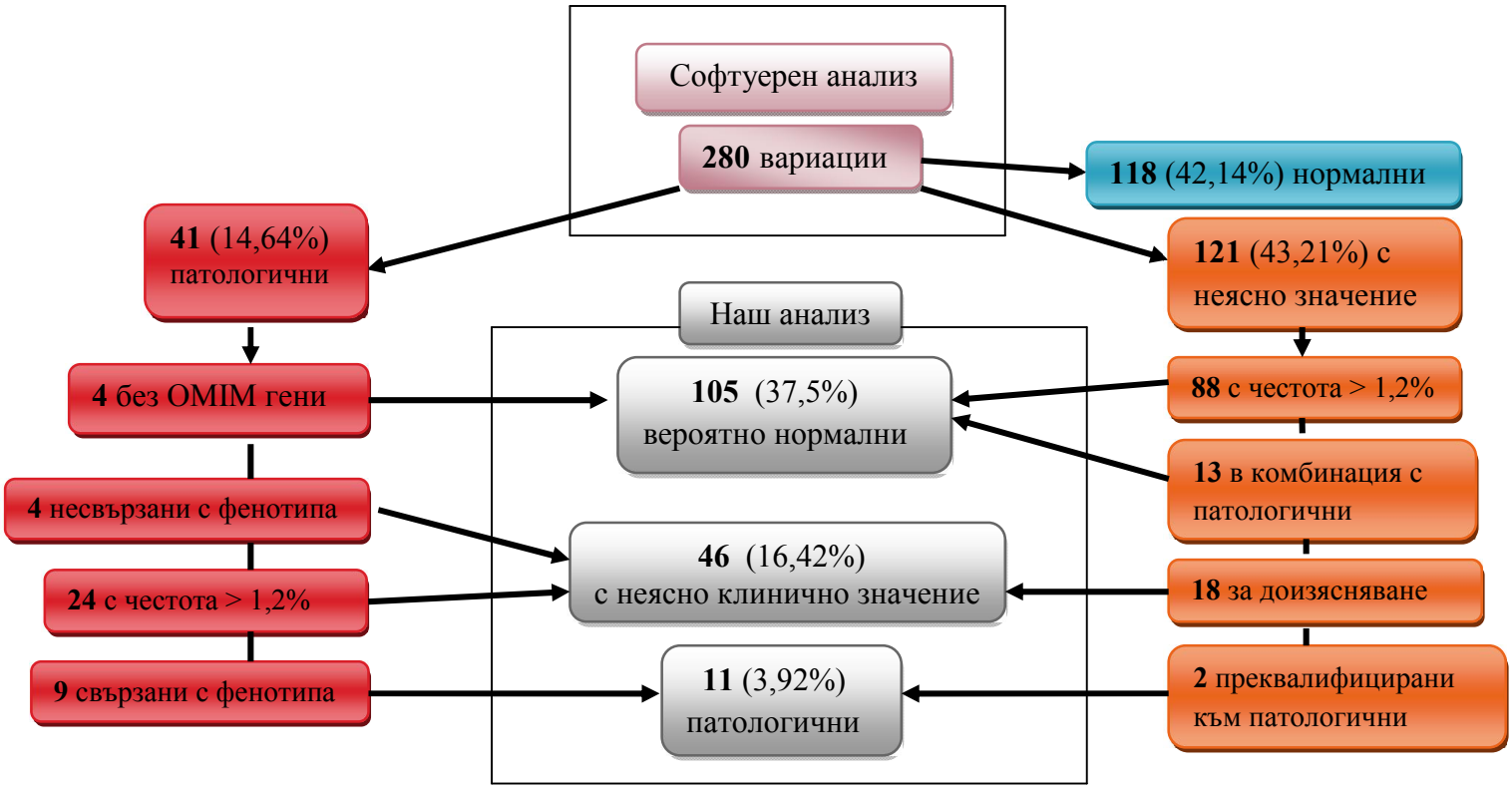
При 4-ма от пациентите идентифицирахме 4 патологични вариации в следните хромозомни локуси: 22q11.22, 8p23.2, 2q13, 4q12. След справка за всяка от тях в DGV с цел разкриване на обхванатите от вариацията гени, установихме, че нито една от 4-те вариации не съдържат OMIM гени, поради което предположихме, че тези вариации са вероятно нормална природа, въпреки определянето им от софтуерната програма като патологични.

7.4 Обобщение на честотите на вариациите в броя копия след интерпретацията на резултатите.

След анализа и интерпретацията на получените резултати, установихме следните честоти за различните вариации в броя копия при изследваната група пациенти:

- От софтуерния анализ са установени 280 вариации на броя копия (CNVs) в генома на изследваните с aCGH пациенти със синдром на вродени аномалии и са класифицирани по следният начин:
  - патологични (41 варианти – 14,64%),
  - с неясно клинично значение (121 – 43,21%) и
  - нормални (118 – 42,14%).
- След прецизно анализиране на резултатите установените варианти бяха групирани в:
  - нормални варианти - 118 (42,14%),
  - патологични – 11 (3,92%),
  - варианти с неясно клинично значение – 46 (16,42%),
  - вероятно нормални варианти – 105 (37,5%).

На фигура 26 е показана честотата и разпределението в подгрупи на различните варианти в броя копия в изследваната група пациенти, преди и след нашето анализиране.



Фигура 26. Схематично представяне на честотите и подгрупите на установените варианти в броя копия сред изследваната група след софтуерен и последващ наш анализ.

8 Заключение

Високата честота на вродените нарушения в развитието (3-5%) и голямото им значение за неонаталната детска смъртност (33%), ги превърна в сериозен проблем в съвременният свят. Голямата им клинична и генетична хетерогенност ги прави трудни за диагностициране, поради което не малък процент (40%), остават етиологично неизяснени. От съществено значение е задълбоченото изследване и анализиране на тази патология, търсенето на нови кандидат гени, откриване на нови генотип-фенотипни корелации с цел подобряване на диагностиката, своевременно лечение на болните, откриване на засегнати родственици и определяне на рекурентният риск, което би могло да намали заболеваемостта, да подобри семейният климат и да се отрази благоприятно на икономическите показатели на държавата и обществото. Всичко това не би било възможно без използването на високорезолютивни методи за детекции на геномна патология като сравнителната геномна хибридизация (СГХ) върху микрочипове и секвениране от следващо поколение, представляващи високочувствителни методи за детекция на малки недоловими с други методи небалансирани аберации.

В настоящото изследване бяха включени общо 81 деца от двата пола, с вродени дефекти на развитието и нормални находки от цитогенетичен анализ. При генетичното изследване на пациентите се приложи ДНК микрочипов анализ с олигонуклеотидни чипове.

В изследванат група пациенти след задълбочен анализ се доказаха 11 патологични вариации свързани с фенотипа, 118 нормални варианта, 46 варианта с неясно клинично значение и беше обособена нова група – „вероятно нормални вариации в броя копия” – 105. Интерпретацията на всички варианти беше направена въз основа на честотата, размера, типа на вариацията и съдържанието на гени, с цел откриване и описване на генотип-фенотипни корелации. Прави впечатление, че немалка част от фенотипните изяви при пациентите остават с неизяснена етиология, което налага допълнителни изследвания за изясняването им.

Молекулното кариотипиране е подходящ метод за идентифициране на геномни аберации и има редица предимствата при диагностициране на вродени аномалии и интелектуална недостатъчност, но също така е очевидна нуждата от задълбочени

популационни проучвания свързани с вида, честотата и значението на идентифицираните варианти. Това ще обогати създадените бази данни и ще доведе до систематизиране и категоризиране на вариантите в броя копия в българската популация, което ще улесни диагностицирането и всички последващи стъпки. Необходимо е и въвеждане на методи с още по-голяма резолюция и чувствителност за да бъдат идентифицирани и анализирани максимален брой аберации при възможно най-голям брой пациенти.

9 Изводи

1. Установени са 280 вариации на броя копия (CNVs) в генома на изследваната група пациенти със синдром на вродени аномалии чрез микрочипова сравнителна геномна хибридизация (aCGH) (среден брой вариации на пациент - 3.5), които са класифицирани от софтуера в три категории- патологични (41 варианти – 14,64%), с неясно клинично значение (121 – 43,21%) и нормални (118 – 42,14%)
2. Анализирана е връзката на патологичните варианти с фенотипа, според която те са подразделени в четири категории:
   - ✓ патологични, асоциирани с малформативния синдром (9 варианта);
   - ✓ без корелация с клиниката (4 варианта), които включихме в групата на варианти с неясно клинично значение;
   - ✓ без съдържание на OMIM гени (4 варианта), които определихме като вероятно нормални,
   - ✓ несъответстващи на използваните критерии за патологичен вариант (24 варианта), които включихме в групата на варианти с неясно клинично значение.
3. Характеризирани са редките патологични копийни варианти в човешкия геном, асоциирани с вродени малформации:
   - ✓ arr 2p16.3(50,982,143-51,314,401)x1; 5q35.2q35.3(175,470,501-177,136,261)x1
   - ✓ arr 10q26.12q26.3(122,804,780-135,434,149)x1
   - ✓ arr 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1; 12p13.33p13.1 (230,451-14,111,977)x3
   - ✓ arr 17q12(34,450,435-36,248,889)x1
   - ✓ arr 22q11.21q11.22(21,561,492-22,905,039)x1
   - ✓ arr 15q11.2q13.1(22,765,658-29,030,488)x3
   - ✓ arr 15q11.2(22,765,658-23,260,485)x1
4. Определени са генотип/фенотипни корелации между гени, локализирани в патологичните вариации и клинични синдроми:

- ✓ *NSD1* и растежа и развитието;
- ✓ *CTBP2* и синапсите в нервната система,
- ✓ *ADRB1* и физиологичните ефекти на адреналина,
- ✓ *DPYSL4* и диференциацията на невроните,
- ✓ *DRD1IP* и паметта и обучението;
- ✓ HNF1B и вторични бъбречни нарушения и невропсихични разстройства;
- ✓ *TBX1* и сърдечните дефекти, цепките на небцето и лицевия дисморфизъм;
- ✓ *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* и развитието на ЦНС;
- ✓ *SNRPN* и аутизмът;
- ✓ *GABRA5, GABRA3,* GABRG3, *MAGEL2, MKRN3, NDN, SNRPN, UBE3A* и неврологични разстройства и проблеми в развитието
- ✓ *KANSL1* и синдром на Koolen de Vries свързан с лицев дисморфизъм, ИН, забавяне в развитието.

5. Вариациите, които софтуера определя с неясно клинично значение, след проведения анализ са определени като:

- ✓ вариации, съдържащи гени, свързани с фенотипа и прекласифицирани като с възможен патологичен характер (2 варианта)
- ✓ варианти с честота над 1,2% в изследваната група (88 варианта) – прекласифицирани като вероятно нормални;
- ✓ малки вариации, комбинирани с големи доказани патологични варианти (13 варианта) - прекласифицирани като вероятно нормални;
- ✓ неясно клинично значение (18 варианта).

6. Обособена е допълнителна категория „вероятно нормални варианти” (105 варианта – 37,5%), в която са включени:

- ✓ варианти с честота над 1,2% в изследваната група (88 варианта – прекласифицирани от вариантите с неясно клинично знаение);
- ✓ Варианти без съдържание на OMIM гени (4 варианта – прекласифицирани от патологичните вариации);
- ✓ малки вариации, комбинирани с големи доказани патологични варианти (13 – прекласифицирани от вариантите с неясно клинично знаение);

7. След извършения анализ, установените 280 CNV са прецизирани и субкласифицирани в подгрупи, различни от определените със софтуера:

- ✓ редки патологични вариации свързани с фенотипа - 11 вместо 41
- ✓ вариации с неясно клинично значение – 46 вместо 121

- ✓ нормални вариации 118
- ✓ вероятно нормални вариации - 105

Установени са 280 вариации на броя копия (CNVs) в генома на изследваната група пациенти със синдром на вродени аномалии чрез микрочипова сравнителна геномна хибридизация (aCGH) (среден брой вариации на пациент - 3.5), които са класифицирани от софтуера в три категории- патологични (41 варианти – 14,64%), с неясно клинично значение (121 – 43,21%) и нормални (118 – 42,14%). След прецизно анализиране на резултатите установените варианти бяха групирани в: нормални варианти - 118 (42,14%), патологични – 11 (3,92%), варианти с неясно клинично значение – 46 (16,42%), вероятно нормални варианти – 105 (37,5%).

10 Приноси

10.1 Приноси с научен характер

1. Характеризирани са редки патологични копийни варианти, асоциирани с вродени малформации, които са принос към описаните вариации в човешкия геном;
2. Определени са гени, локализирани в CNV, които асоциират с фенотипа и служат като обективен критерий за прецизиране на вариациите като патологични.
3. Въведена и характеризирана е нова допълнителна категория на „вероятно нормални варианти".

10.2 Приноси с приложен характер

1. Разширена е ДНК банката от пациенти с вродени малформации, която се съхранява, за да се използва за продължаване на изследванията с други геномни технологии.
2. Предложен е алгоритъм за интерпретация на вариантите в броя копия в генома.

11 Използвана литература:

1. Minino, A.M., et al., Deaths: final data for 2004. Natl Vital Stat Rep, 2007. 55(19): p. 1-119.
2. Pergament, E., et al., The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. Prenat Diagn, 2000. 20(3): p. 215-20.
3. Thein, A.T., et al., An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cytogenetics in prenatal diagnosis. Prenat Diagn, 2000. 20(4): p. 275-80.
4. Симеонов, Е. Г. Проблеми на клиничната дисморфология в педиатрията. Научен обзор, София, Медицинска академия. Център за научна информация по медицина и здравеопазване, 1989.
5. Симеонов, Е., Бояджиев, С. Регистрация на вродените аномалии при новородени деца. - Педиатрия. 30(4), 1991, 13-20.
6. Симеонов, Е., Бояджиев, С. Диагноза и профилактика на дисморфичните синдроми. - Педиатрия. 32, 1993, 10-16.
7. Симеонов, Е. Ранна диагноза и профилактика на вродени аномалии. Докторска дисертация (автореферат). 1995.
8. Мумджиев, Х., Петрова, Н., Добрева, А. Честота и форми на вродените аномалии в Старозагорски регион за тригодишен период. - Педиатрия. 33, 1994, 12-15.
9. Калайджиева, М., Праматарова, Т., Вакрилова, Л. Честота и структура на вродените аномалии в ДУП "Майчин дом, София за периода " 1992-1996 година. - Акушерство и гинекология. 37, 1998, 15-18.
10. Калайджиева, М., А. Попиванова &Е. Дойчева. Клинико-епидемиологично проучване на дефектите на невралната тръба при новородени деца. - Акушерство и гинекология. 39, 2000, 16-19.
11. Тинчева, Р., М. Малинова &Д. Захариев. Летална форма на артрогрипоза у новородено-Pena- Shokeir type I синдром. - Педиатрия. 1, 2006, 41-43.
12. Димитрова, В., Марков, Д., Чернев, Т. Правила за оценка на носната кост на плода между 11-14 гестационна седмица. - Бълг. спис. ултразвук акуш. гинекол. 2, 2009, 12-16.
13. Ковачева, К. (2009). Диагностични, профилактични и епидемиологични аспекти на регистрацията на вродените аномалии. Дисертация, Плевен.
14. Dimova, I., R. Vazharova, D. Nikolova, R. Tincheva, D. Nesheva &D. Toncheva. Whole genome analysis by array-based comparative genomic hybridization in patients with congenital malformations. - BJMG. 11(1), 2008, 33-40.
15. Хаджидекова С. Микроструктурни геномни аберации при пациенти с вродени малформации. 2011г.
16. Cohen, M., The child with multiple birth defects. New York, Raven Press, 1982.
17. Schalock, R.L., et al., The renaming of mental retardation: understanding the change to the term intellectual disability. Intellect Dev Disabil, 2007. 45(2): p. 116-24.
18. Arata N., Murashima A., Ito S. et al. Pregnancy outcomes of exposure to methimazole (POEM) study: An interim report. ATA 2014, oral abstract 219 http://www.thyroid.org
19. Wu Y., Viana M., Thirumangalathu S., Loeken M. AMP-activated protein kinase mediates effects of oxidative stress on embryo gene expression in a mouse model of diabetic embryopathy. Diabetologia. 2012; 55(1):245-54 http://www.diabetologia-journal.org
20. Singh AE, Sutherland K, Lee B et al. Resurgence of early congenital syphilis in Alberta. CMAJ., 2007; 177: 33-36.
21. Pastuszak AL, Levy M, Schick B et al. Outcome after maternal varicella infection in the first 20 weeks of pregnancy. N. Engl. J. Med., 1994; 330: 901-905.

22. Ely JW, Yankowitz J, Bowdler NC. Evaluation of pregnant women exposed to respiratory viruses. Am. Fam. Physician., 2000; 61: 3065–3074.
23. Zaret KS. Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. // Curr. Opin. Genet. Dev. 11 (5). October 2001. DOI:10.1016/S0959-437X(00)00234-3. c. 568 – 74.
24. Burton, B.K. and K. Praveen, Dysmorphology, in Congenital malformatio 2007. p. 3-11.
25. Dolk, H., B. Armstrong, K. Lachowycz, M. Vrijheid, J. Rankin, L. Abramsky, P. A. Boyd &D. Wellesley. Ambient air pollution and risk of congenital anomalies in England, 1991-1999. - Occup Environ Med. 67(4), 2010, 223-227.
26. Halliday, J. L., O. C. Ukoumunne, H. W. Baker, S. Breheny, A. M. Jaques, C. Garrett, D. Healy &D. Amor. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. - Hum Reprod. 25(1), 2010, 59-65.
27. Rankin, J., Pattenden, S., Abramsky, L., Boyd, P., Jordan, H., Stone, D., Vrijheid, M., Wellesley, D., Dolk, H. Prevalence of congenital anomalies in five British regions, 1991-99. - Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 90(5), 2005, F374-F379.
28. Wellesley, D., P. Boyd, H. Dolk &S. Pattenden. An aetiological classification of birth defects for epidemiological research. - J Med Genet. 42(1), 2005, 54-57.
29. (Christianson et al., 2006).
30. Lobo, I. & Zhaurova, K. (2008) Birth defects: causes and statistics. Nature Education 1(1):18
31. Rajangam S, Devi R. Consanguinity and chromosomal abnormality in mental retardation and or multiple congenital anomaly. J Anat Soc India 2007;56(2):30-33
32. Burton, B. K.K. Praveen. Dysmorphology, In "Congenital malformation", 2007. 3-11.
33. Kalter, H.J. Warkany. Congenital malformations (second of two parts). - N Engl J Med. 308(9), 1983a, 491-497.
34. Kalter, H.J. Warkany. Medical progress. Congenital malformations: etiologic factors and their role in prevention (first of two parts). - N Engl J Med. 308(8), 1983b, 424-431
35. Nelson, K.L. B. Holmes. Malformations due to presumed spontaneous mutations in newborn infants. - N Engl J Med. 320(1), 1989, 19-23.
36. Andrew E. Czeizel. Birth Defects Are Preventable Int J Med Sci. 2005; 2(3): 91–92.
37. Martin Lammens, Hans J. ten Donkelaar, John M.G. van Vugt, Gerard van Noort, Michèl Willemsen and Ben Hamel Causes of Congenital Malformations. Clinical neuroembryology, chapter 3.
38. Enid Gilbert-Barness (ed). St. Louis, MO, Mosby-Year Book, 1997, 1,732 pages, in two volumes. Potter's pathology of the fetus and infant
39. Human Chromosomes (4th edn). Orlando J. Miller and Eeva Therman. Springer-Verlag, New York. 2001. Pp. 501
40. Shiota K (1993) Teratothanasia: Prenatal loss of abnormal conceptuses and the prevelence of various malformations during human gestation. Birth defects Orig Artic ser 29; 189-199
41. Kalousek DK, Barrett IJ, Lestou VS.Prenat Diagn. 1997 Misconceptions about mosaicism.Sep;17(9):888-9.
42. Jean W. Keeling, Patricia A. Boyd Congenital Abnormalities and the Examination of the Fetus Following Prenatal Suspicion of Congenital Abnormality Chapter :Fetal and Neonatal Pathology pp 111-152
43. Hall JG.Mild expression of the Pfeiffer syndrome.Clin Genet. 1988 Aug;34(2):144
44. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. Nat Rev Genet. 2002 Oct;3(10):748-58.
45. Sanders, Roger C. (2002-01-01). Structural Fetal Abnormalities: The Total Picture.
46. DeCherney, Alan H.; Nathan, Lauren; Goodwin, T. Murphy; Laufer, Neri, eds. (2007). Current diagnosis & treatment: Obstetrics & gynecology (10th ed.). New York: McGraw-Hill.

47. Mary Kugler, R.N. (2005-08-20). "Chromosome 16 Disorders". About.com:Rare Diseases. About, Inc. Retrieved 2008-01-30.
48. Groli, C; Cerri, V; Tarantini, M; Bellotti, D; Jacobello, C; Gianello, R; Zanini, R; Lancetti, S; Zaglio, S (1996). "Maternal serum screening and trisomy 16 confined to the placenta". Prenatal diagnosis. **16** (8)
49. I. Kroes,[1] S. Janssens,[2] and P. Defoort 2014Ultrasound features in trisomy 13 (Patau syndrome) and trisomy 18 (Edwards syndrome) in a consecutive series of 47 cases
50. (Blasco MA, Gasser SM, Lingner J Genes Dev. 1999 Sep 15; 13(18):2353-9.Telomeres and telomerase
51. Feuerbach F, Galy V, Trelles-Sticken E, Fromont-Racine M, Jacquier A, Gilson E, Olivo-Marin JC, Scherthan H, Nehrbass U Nat Cell Biol. 2002 Mar; 4(3):214-21.Nuclear architecture and spatial positioning help establish transcriptional states of telomeres in yeast.
52. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Sep; 85(18):6622-6A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes.
53. McCulloch R, Gene conversions mediating antigenic variation in Trypanosoma brucei can occur in variant surface glycoprotein expression sites lacking 70-base-pair repeat sequences. Rudenko G, Borst PMol Cell Biol. 1997 Feb; 17(2):833-43.
54. Carlson M, Celenza JL, Eng FJ Mol Cell Biol. 1985 Nov; 5(11):2894-902.Evolution of the dispersed SUC gene family of Saccharomyces by rearrangements of chromosome telomeres.
55. Brown, W. R., P. J. MacKinnon, A. Villasante, N. Spurr, V. J. Buckle &M. J. Dobson. Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. - Cell. 63(1), 1990, 119-132.
56. Flint, J., J. Rochette, C. F. Craddock, C. Dode, B. Vignes, S. W. Horsley, et al. Chromosomal stabilisation by a subtelomeric rearrangement involving two closely related Alu elements. - Hum Mol Genet. 5(8), 1996, 1163-1169.
57. Flint, J., G. P. Bates, K. Clark, A. Dorman, D. Willingham, B. A. Roe, G. Micklem, D. R. Higgs &E. J. Louis. Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. - Hum Mol Genet. 6(8), 1997, 1305-1313.;
58. María del Carmen Calderón, María-Dolores, Rey Adoración Cabrera & Pilar Prieto The subtelomeric region is important for chromosome recognition and pairing during meiosis 2014
59. Blouin, J. L., D. H. Christie, A. Gos, A. Lynn, M. A. Morris, D. H. Ledbetter, A. Chakravarti &S. E. Antonarakis. A new dinucleotide repeat polymorphism at the telomere of chromosome 21q reveals a significant difference between male and female rates of recombination. - Am J Hum Genet. 57(2), 1995, 388-394.
60. Saccone, S., A. De Sario, G. Della Valle &G. Bernardi. The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. - Proc Natl Acad Sci USA. 89(11), 1992, 4913-4917.
61. Tjitske Kleefstra Han G. Brunner Jeanne Amiel Astrid R. Oudakker Willy M. Nillesen Alex Magee David Geneviève Valérie Cormier-Daire Hilde van Esch Jean-Pierre Fryns Ben C.J. Hamel Erik A. Sistermans Bert B.A. de Vries Hans van BokhovenLoss-of-Function Mutations in Euchromatin Histone Methyl Transferase 1 (EHMT1) Cause the 9q34 Subtelomeric Deletion Syndrome. 2006
62. Knight, S. J.J. Flint. Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. - J Med Genet. 37(6), 2000, 401-409.

63. Riegel, M., A. Baumer, M. Jamar, K. Delbecque, C. Herens, A. Verloes &A. Schinzel. Submicroscopic terminal deletions and duplications in retarded patients with unclassified malformation syndromes. - Hum Genet. 109(3), 2001, 286-294.
64. Rodriguez, L., M. L. Martinez-Fernandez, E. Mansilla, J. Mendioroz, R. M. Arteaga, J. F. Toral, et al. Screening for subtelomeric chromosome alteration in a consecutive series of newborns with congenital defects. - Clin Dysmorphol. 17(1), 2008, 5-12..
65. (Scriver, 1995).
66. Andrew M. Schaefer, Robert W. Taylor, Douglass M. Turnbull, Patrick F. Chinnery The epidemiology of mitochondrial disorders—past, present and future 2004
67. McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®; http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)
68. Hori A, Peiffer Y, Pfeiffer RA, Lizuka R, 1980; Cerebello- cortical heterotopias in dentate nucleus and other microdysgenesis in trisomy D1 (Patau) syndrome, Brain Dev 2: 345 - 352
69. Ahdab-Barmada and Claassen 1990; Clinical Case 3.1).
70. Iafrate, A. J., L. Feuk, M. N. Rivera, M. L. Listewnik, P. K. Donahoe, Y. Qi, S. W. Scherer &C. Lee. Detection of large-scale variation in the human genome. - Nat Genet. 36(9), 2004, 949-951.
71. Sebat, J., B. Lakshmi, J. Troge, J. Alexander, J. Young, P. Lundin, et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. - Science. 305(5683), 2004, 525-528..
72. Turnpenny, P. & Ellard, S. (2005). Emery's Elements of Medical Genetics, 12th. ed. Elsevier, London.
73. Brinkmann, Bernd; Klintschar, Michael; Neuhuber, Franz; Hühne, Julia; Rolf, Burkhard (1998-06-01). "Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat". The American Journal of Human Genetics. 62 (6): 1408–1415. doi:10.1086/301869. PMC 1377148. PMID 9585597.
74. Feuk, L., A. R. Carson &S. W. Scherer. Structural variation in the human genome. - Nat Rev Genet. 7(2), 2006, 85-97.
75. Kruglyak, L.D. A. Nickerson. Variation is the spice of life. - Nat Genet. 27(3), 2001, 234-236.
76. Pennisi, E. Breakthrough of the year. Human genetic variation. - Science. 318(5858), 2007, 1842-1843.
77. Redon, R. et al. Global variation in copy number in the human genome. Nature 444, 447 (2006).
78. Freeman, J. L., G. H. Perry, L. Feuk, R. Redon, S. A. McCarroll, D. M. Altshuler, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. - Genome Res. 16(8), 2006, 949-961.
79. Suzanne Clancy, Ph.D. © 2008 Nature Education Citation: Clancy, S. (2008) Copy number variation. Nature Education 1(1):95
80. Cheng, Z., *et al*. A genome-wide comparison of recent chimpanzee and human segmental duplications. Nature 437*,* 88–93 (2005)
81. Stankiewicz, P., & Lupski, J. R. Genomic architecture, rearrangements, and genomic disorders. Trends in Genetics 18, 74–82 (2002)
82. Stefansson H[1], Helgason A, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Masson G, Barnard J, Baker A, Jonasdottir A, Ingason A, Gudnadottir VG, Desnica N, Hicks A, Gylfason A, Gudbjartsson DF, Jonsdottir GM, Sainz J, Agnarsson K, Birgisdottir B, Ghosh S, Olafsdottir A, Cazier JB, Kristjansson K, Frigge ML, Thorgeirsson TE, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. A common inversion under selection in Europeans.Nat Genet. 2005 Feb;37(2):129-37. Epub 2005 Jan 16.

83. Perry, G. H., N. J. Dominy, K. G. Claw, A. S. Lee, H. Fiegler, R. Redon, et al. Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. - Nat Genet. 39(10), 2007, 1256-1260.
84. Bejerano, G., et al. Ultraconserved elements in the human genome. Science 304, 1321–1325 (2004)
85. Nguyen, D. Q., et al. Bias of selection on human copy number variants. PLoS Genetics 2, e2 (2006)
86. Levy, S., G. Sutton, P. C. Ng, L. Feuk, A. L. Halpern, B. P. Walenz, et al. The diploid genome sequence of an individual human. - PLoS Biol. 5(10), 2007, e254..
87. Shoukier, M., et al., Array CGH in patients with developmental delay or intellectual disability: are there phenotypic clues to pathogenic copy number variants? Clin Genet, 2013. 83(1): p. 53-65.
88. Vorsanova, S.G., et al., [Genomic abnormalities in children with mental retardation and autism: the use of comparative genomic hybridization in situ (HRCGH) and molecular karyotyping with DNA-microchips (array CGH)]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2013. 113(8): p. 46-9.
89. Kashevarova, A.A., et al., Array CGH analysis of a cohort of Russian patients with intellectual disability. Gene, 2014. 536(1): p. 145-50.
90. Caramaschi, E., et al., Predictive diagnostic value for the clinical features accompanying intellectual disability in children with pathogenic copy number variations: a multivariate analysis. Ital J Pediatr, 2014. 40: p. 39.
91. Lay-Son, G., et al., Chromosomal microarrays testing in children with developmental disabilities and congenital anomalies. J Pediatr (Rio J), 2015. 91(2): p. 189-95
92. Choucair, N., et al., Contribution of copy number variants (CNVs) to congenital, unexplained intellectual and developmental disabilities in Lebanese patients. Mol Cytogenet, 2015. 8: p. 26.
93. Coutton, C., et al., Array-CGH in children with mild intellectual disability: a population-based study. Eur J Pediatr, 2015. 174(1): p. 75-83.
94. Vaccari CM[1], Tassano E[2], Torre M[3], Gimelli S[4], Divizia MT[2], Romanini MV[5], Bossi S[1], Musante I[1], Valle M[6], Senes F[7], Catena N[7], Bedeschi MF[8], Baban A[2,9], Calevo MG[10], Acquaviva M[1], Lerone M[2], Ravazzolo R[1,2,11], Puliti ABMC Med Genet. 2016 Nov 25;17(1):89.Assessment of copy number variations in 120 patients with Poland syndrome.
95. Dimopoulos A[1], Sicko RJ[2], Kay DM[2], Rigler SL[1], Fan R[1], Romitti PA[3], Browne ML[4,5], Druschel CM[4,5], Caggana M[2], Brody LC[6], Mills JL[1].Am J Med Genet A. 2016 Nov 30. doi: 10.1002/ajmg.a.37868. [Epub ahead of print] Copy number variants in a population-based investigation of Klippel-Trenaunay syndrome.
96. J Neurosci Res. 2016 Nov 8. doi: 10.1002/jnr.23970. [Epub ahead of print]Unraveling the genetic architecture of copy number variants associated with schizophrenia and other neuropsychiatric disorders.Rutkowski TP[1], Schroeder JP[1], Gafford GM[1], Warren ST[1], Weinshenker D[1], Caspary T[1], Mulle JG[1,2].
97. Abyzov, A., et al., CNVnator: An approach to discover, genotype and characterize typical and atypical CNVs from family and population genome sequencing. Genome Res, 2011.
98. Campbell, C.D., et al., Population-genetic properties of differentiated human copy-number polymorphisms. Am J Hum Genet, 2011. 88(3): p. 317-32.
99. Fu, Y., et al., Absence of AVPR2 copy number variation in eunatremic and dysnatremic subjects in non-Hispanic Caucasian populations. Physiol Genomics, 2010. 40(3): p. 121-7.
100. Itsara, A., et al., Population analysis of large copy number variants and hotspots of human genetic disease. Am J Hum Genet, 2009. 84(2): p. 148-61.

101. Pinto, D., et al., Copy-number variation in control population cohorts. Hum Mol Genet, 2007. 16 Spec No. 2: p. R168-73.
102. Lee, C., A. J. Iafrate &A. R. Brothman. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. - Nat Genet. 39(7 Suppl), 2007a, S48-54.
103. Scherer, S. W., C. Lee, E. Birney, D. M. Altshuler, E. E. Eichler, N. P. Carter, M. E. Hurles &L. Feuk. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. - Nat Genet. 39(7 Suppl), 2007, S7-15..
104. Cheung, S. W., C. A. Shaw, W. Yu, J. Li, Z. Ou, A. Patel, et al. Development and validation of a CGH microarray for clinical cytogenetic diagnosis. - Genet Med. 7(6), 2005, 422-432.
105. Shaffer, L. G.B. A. Bejjani. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. - Cytogenet Genome Res. 115(3-4), 2006, 303-309.].
106. Tyson, C., B. McGillivray, C. Chijiwa &E. Rajcan-Separovic. Elucidation of a cryptic interstitial 7q31.3 deletion in a patient with a language disorder and mild mental retardation by array-CGH. - Am J Med Genet A. 129A(3), 2004, 254-260..
107. Erdogan, F., R. Ullmann, W. Chen, M. Schubert, S. Adolph, C. Hultschig, et al. Characterization of a 5.3 Mb deletion in 15q14 by comparative genomic hybridization using a whole genome "tiling path" BAC array in a girl with heart defect, cleft palate, and developmental delay. - Am J Med Genet A. 143(2), 2007, 172-178.
108. Tzschach, A., C. Menzel, F. Erdogan, M. Schubert, M. Hoeltzenbein, G. Barbi, et al. Characterization of a 16 Mb interstitial chromosome 7q21 deletion by tiling path array CGH. - Am J Med Genet A. 143(4), 2007, 333-337.]
109. Barrett, M. T., A. Scheffer, A. Ben-Dor, N. Sampas, D. Lipson, R. Kincaid, et al. Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. - Proc Natl Acad Sci U S A. 101(51), 2004, 17765-17770.
110. Friedman, J. M., Б. Baross, A. D. Delaney, A. Ally, L. Arbour, J. Asano, et al. Oligonucleotide Microarray Analysis of Genomic Imbalance in Children with Mental Retardation. - The American Journal of Human Genetics. 79(3), 2006b, 500-513.
111. Selzer, R. R., T. A. Richmond, N. J. Pofahl, R. D. Green, P. S. Eis, P. Nair, A. R. Brothman &R. L. Stallings. Analysis of chromosome breakpoints in neuroblastoma at sub-kilobase resolution using fine-tiling oligonucleotide array CGH. - Genes Chromosomes Cancer. 44(3), 2005, 305-319.
112. Slater, H. R., D. K. Bailey, H. Ren, M. Cao, K. Bell, S. Nasioulas, R. Henke, K. H. Choo &G. C. Kennedy. High-resolution identification of chromosomal abnormalities using oligonucleotide arrays containing 116,204 SNPs. - Am J Hum Genet. 77(5), 2005, 709-726..
113. Shaffer, L. G., C. D. Kashork, R. Saleki, E. Rorem, K. Sundin, B. C. Ballif &B. A. Bejjani. Targeted genomic microarray analysis for identification of chromosome abnormalities in 1500 consecutive clinical cases. - J Pediatr. 149(1), 2006, 98-102.
114. Ballif, B. C., S. A. Hornor, E. Jenkins, S. Madan-Khetarpal, U. Surti, K. E. Jackson, et al. Discovery of a previously unrecognized microdeletion syndrome of 16p11.2-p12.2. - Nat Genet. 39(9), 2007, 1071-1073.
115. Barber, J. C., V. K. Maloney, S. Huang, D. J. Bunyan, L. Cresswell, E. Kinning, et al. 8p23.1 duplication syndrome; a novel genomic condition with unexpected complexity revealed by array CGH. - Eur J Hum Genet. 16(1), 2008, 18-27.
116. Brunetti-Pierri, N., D. K. Grange, Z. Ou, D. A. Peiffer, S. K. Peacock, M. L. Cooper, et al. Characterization of de novo microdeletions involving 17q11.2q12 identified through chromosomal comparative genomic hybridization. - Clin Genet. 72(5), 2007, 411-419.

117. Chabchoub, E., J. R. Vermeesch, T. de Ravel, P. de Cock &J. P. Fryns. The facial dysmorphy in the newly recognised microdeletion 2p15-p16.1 refined to a 570 kb region in 2p15. - J Med Genet. 45(3), 2008, 189-192.
118. Eichler, E. E.A. W. Zimmerman. A hot spot of genetic instability in autism. - N Engl J Med. 358(7), 2008, 737-739.
119. Koolen, D. A., L. E. Vissers, R. Pfundt, N. de Leeuw, S. J. Knight, R. Regan, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. - Nat Genet. 38(9), 2006, 999-1001.
120. Rajcan-Separovic, E., C. Harvard, X. Liu, B. McGillivray, J. G. Hall, Y. Qiao, et al. Clinical and molecular cytogenetic characterisation of a newly recognised microdeletion syndrome involving 2p15-16.1. - J Med Genet. 44(4), 2007, 269-276..
121. Veltman, J. A.B. B. de Vries. Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? - J Mol Diagn. 8(5), 2006, 534-537; discussion 537-539.
122. DGV http://projects.tcag.ca/variation/.
123. Conrad DF, Andrew TD, Carter NP, Hurles ME, Pritchard JK. A high-resolution survey of deletion polymorphism in the human genome. Nat Genet. 2006;38:75–81. [PubMed]
124. Lupski JR. Genomic rearrangements and sporadic disease. Nat Genet. 2007;39(7 Suppl):S43–S47.[PubMed]
125. UCSC http://genome.ucsc.edu/.
126. DECHIPER http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/decipher/.
127. ECARUCA www.ecaruca.net.
128. CNVProject http://www.sanger.ac.uk/humgen/cnv/help/.
129. CAD http://www.ukcad.org.uk/cocoon/ukcad/.
130. CAC http://www.som.soton.ac.uk/research/geneticsdiv/Anomaly%20Register/.
131. HSVDatabase http://humanparalogy.gs.washington.edu/structuralvariation/.
132. MCNdb http://www.mcndb.org/index.jsp.
133. Khaja, R., J. Zhang, J. R. MacDonald, Y. He, A. M. Joseph-George, J. Wei, et al. Genome assembly comparison identifies structural variants in the human genome. - Nat Genet. 38(12), 2006, 1413-1418.
134. McCarroll, S. A., T. N. Hadnott, G. H. Perry, P. C. Sabeti, M. C. Zody, J. C. Barrett, et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. - Nat Genet. 38(1), 2006, 86-92.
135. Hansson, K., K. Szuhai, J. Knijnenburg, A. van Haeringen &J. de Pater. Interstitial deletion of 6q without phenotypic effect. - Am J Med Genet A. 143A(12), 2007, 1354-1357.
136. Korbel JO, Urban AE, Affourtit JP, Godwin B, Grubert F, Simons JF, Kim PM, Palejev D, Carriero NJ, Du L, et al. Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. Science. 2007;318:420–426.
137. Durbin RM, Abecasis GR, Altshuler DL, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Gibbs RA, Hurles ME, McVean GA. A map of human genome variation from population-scale sequencing. Nature. 2010;467:1061–1073.
138. Mills RE, Walter K, Stewart C, Handsaker RE, Chen K, Alkan C, Abyzov A, Yoon SC, Ye K, Cheetham RK, et al. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. Nature. 2011;470:59–65.
139. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, Aerts J, Andrews TD, Barnes C, Campbell P, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. Nature. 2010;464:704–712.
140. Conrad DF, Bird C, Blackburne B, Lindsay S, Mamanova L, Lee C, Turner DJ, Hurles ME. Mutation spectrum revealed by breakpoint sequencing of human germline CNVs. Nat Genet. 2010;42:385–391.

141. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, Saemundsen E, Stefansson H, Ferreira MA, Green T, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. N Engl J Med. 2008;358:667–675.
142. Brunetti-Pierri N, Grange DK, Ou Z, Peiffer DA, Peacock SK, Cooper ML, Eng PA, Lalani SR, Chinault AC, Gunderson KL, et al. Characterization of de novo microdeletions involving 17q11.2q12 identified through chromosomal comparative genomic hybridization. Clin Genet. 2007;72:411–419.]
143. Bedoyan JK, Kumar RA, Sudi J, Silverstein F, Ackley T, Iyer RK, Christian SL, Martin DM. Duplication 16p11.2 in a child with infantile seizure disorder. Am J Med Genet A. 152A:1567–1574.
144. Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, Scott DA, Probst FJ, Craigen WJ, Graham BH, Pursley A, et al. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. J Med Genet. 47:332–341.
145. Liu P, Erez A, Nagamani SC, Dhar SU, Kolodziejska KE, Dharmadhikari AV, Cooper ML, Wiszniewska J, Zhang F, Withers MA, et al. Chromosome catastrophes involve replication mechanisms generating complex genomic rearrangements. Cell. 2011;146:889–903.
146. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. Cell. 2011;144:27–40.
147. Chromothripsis and Human Disease: Piecing Together the Shattering ProcessChristopher A. Maher[1,2,3,*] and Richard K. Wilson 2012 (2013)
148. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. (2011). "Massive Genomic Rearrangement Acquired in a Single Catastrophic Event during Cancer Development". Cell. 144: 27–40. doi:10.1016/j.cell.2010.11.055.
149. Lee, J. A., C. M. Carvalho &J. R. Lupski. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. - Cell. 131(7), 2007b, 1235-1247.
150. Turner, D. J., M. Miretti, D. Rajan, H. Fiegler, N. P. Carter, M. L. Blayney, S. Beck &M. E. Hurles. Germline rates of de novo meiotic deletions and duplications causing several genomic disorders. - Nat Genet. 40(1), 2008, 90-95.
151. Venturin M, Gervasini C, Orzan F, et al. (June 2004). "Evidence for non-homologous end joining and non-allelic homologous recombination in atypical NF1 microdeletions". Hum. Genet. 115 (1): 69–80. doi:10.1007/s00439-004-1101-2
152. Koolen DA, Sharp AJ, Hurst JA, et al. (November 2008). "Clinical and molecular delineation of the 17q21.31 microdeletion syndrome". J. Med. Genet. 45 (11): 710–20. doi:10.1136/jmg.2008.058701.
153. Willatt L, Cox J, Barber J, et al. (July 2005). "3q29 microdeletion syndrome: clinical and molecular characterization of a new syndrome". Am. J. Hum. Genet. 77 (1): 154–60. doi:10.1086/431653.
154. Moore JK, Haber JE (May 1996). "Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae". Molecular and Cellular Biology. 16 (5): 2164–73. doi:10.1128/mcb.16.5.2164.
155. Espejel S, Franco S, Rodríguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA (May 2002). "Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres". The EMBO Journal. 21 (9): 2207–19. doi:10.1093/emboj/21.9.2207.

156. McVey M, Lee SE (2008). "MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings". Trends Genet. 24 (11): 529–38. doi:10.1016/j.tig.2008.08.007.
157. Hastings PJ, Ira G, Lupski JR PLoS Genet. 2009 Jan; 5(1):e1000327.A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation.
158. Feng Zhang,[1] Mehrdad Khajavi,[1] Anne M Connolly,[2] Charles F Towne,[3] Sat Dev Batish,[3] and James R Lupski 2015 The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans
159. Lupski JR, Stankiewicz P: Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS Genet. 2005, 1: e49-10.1371/journal.pgen.0010049.
160. Bauters M, Van Esch H, Friez MJ, Boespflug-Tanguy O, Zenker M, Vianna-Morgante AM, Rosenberg C, Ignatius J, Raynaud M, Hollanders K, Govaerts K, Vandenreijt K, Niel F, Blanc P, Stevenson RE, Fryns JP, Marynen P, Schwartz CE, Froyen G: Non-recurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. Genome Res. 2008, 18: 847-858. 10.1101/gr.075903.107.
161. del Gaudio D, Fang P, Scaglia F, Ward PA, Craigen WJ, Glaze DG, Neul JL, Patel A, Lee JA, Irons M, Berry SA, Pursley AA, Grebe TA, Freedenberg D, Martin RA, Hsich GE, Khera JR, Friedman NR, Zoghbi HY, Eng CM, Lupski JR, Beaudet AL, Cheung SW, Roa BB: Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. Genet Med. 2006, 8: 784-792.
162. Merla, G., C. Howald, C. N. Henrichsen, R. Lyle, C. Wyss, M. T. Zabot, S. E. Antonarakis &A. Reymond. Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes. - Am J Hum Genet. 79(2), 2006, 332-341.
163. Rogers, J.M., Kavlock, R.J. (1996). "Developmental toxicology". In C.D. Klaassen (ed.): Casarett & Doull's Toxicology, (5th ed.). pp. 301-331. New York: McGraw-Hill.
164. James G. Wilson (1973). Environment and Birth Defects (Environmental Science Series). London: Academic Pr.
165. Brent RL. The cause and prevention of human birth defects: what have we learned in the past 50 years? Congenit Anom (Kyoto) 2001;41:3–21.
166. Barish RJ. In-flight radiation exposure during pregnancy. Obstet Gynecol 2004;103:1326–1330.
167. Fattibene P, Mazzei F, Muccetelli C, Risica S. Prenatal exposure to ionizing radiation: sources, effects, and regulatory aspects. Acta Pediatr1999;88:693–702.
168. Hall JG. Genomic imprinting. Arch Dis Child 1990;65:1013.
169. Newell M-L, McIntyre J. Congenital and Perinatal Infections: Prevention, Diagnosis and Treatment, Cambridge Univ Press, Cambridge,
170. Marecki MA, Bozzette M. Infections in the perinatal period. J Perinat Neonatal Nurs 2008;22:173–174.
171. Beckman DA, Brent RL. Mechanism of known environmental teratogens: drugs and chemicals, Clin Perinatal 1986;13:649–687.
172. Paryani SG, Arvin AM. Intrauterine infection with varicellazoster virus after maternal varicella. NEJM 1986;314:1542–1546.
173. Stevenson RE. The environmental basis of human anomalies. In: Human Malformations (Stevenson RE, Ed), Oxford Univ Press, New York, 1993; p 37.
174. Carrington D. Maternal serum alpha-fetoprotein: a marker of fetal aplastic crisis during intrauterine human parvovirus infection, Lancet1987;1:433–435.

175. Schwartz TF, Nerlich A, Hottentrager B, Jager G, Weist I, Kantimm S, Ruggendorf H, Schultz M, Gloning KP, Schramm T. Parvovirus B19 infection of the fetus. Histology and in-situ hybridization. Am J Clin Pathol1991;96:121–126.
176. Weiland HT. Parvovirus B19 associated with fetal abnormality, Lancet1987;1:682–683.
177. Harter CA, Benirschke K. Fetal syphilis in the first trimester. Am J Obstet Gynecol 1976;124:705–711
178. Giannoulis C, Zournatzi B, Giomisi A, Diza E, Tzafettas I. Toxoplasmosis during pregnancy: a case report and review of literature. Hippokratia2008;12:139–143.
179. Walker WL, Lindsey NP, Lehman JA, Krow-Lucal ER, Rabe IB, Hills SL, Martin SW, Fischer M, Staples JE. Zika Virus Disease Cases - 50 States and the District of Columbia, 2016 Sep 16;65(36):983-6. doi: 10.15585/mmwr.mm6536e5. January 1-July 31, 2016.
180. Siegel M, Greenberg M. Poliomyelitis in pregnancy: effect on fetus and newborn infant. J Pediatr 1956;49:280–288.
181. Moss PD, Hefferman CK, Thurston JG. Enteroviruses and congenital abnormalities, Br Med J 1967;1:110–111.Lin HH, Lee TY, Chen DS, Sung TL, Ohto H, Etoh T, Kawana T, Mizuno M. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus. J Pediatr1987;111: 877–881.
182. Plect H, Graham JM, Smith DW. Central nervous system and facial defects associated with maternal hyperthermia at 4 to 14 weeks' gestation. Pediatrics 1981;67:785–789.
183. Li DK, Janevic T, Odouli R, Liu L. Hot tub use during pregnancy and the risk of miscarriage. Am J Epidemiol 2003;158: 931–937.
184. Edwards MJ. Hyperthermia and fever during pregnancy. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol 2006;76:507–516.
185. Smith DW, Clarren SK, Harvey MAS. Hyperthermia as a possible teratogenic agent. J Pediatr 1978;92:878–883.
186. Shiota K. Neural tube defects and maternal hyperthermia in early pregnancy: epidemiology in a human embryonic population. Am J Med Genet 1982;12:281–288.
187. Fisher NL, Smith DW. Hyperthermia as a possible cause of occipital encephalocoele. Clin Res 1980;28:116A.
188. Jones MC, Kosaki K, Bird LM. Disruptive defects of the brain and spinal cord as a consequence of cardiopulmonary bypass and hypothermia at 18 weeks gestation.
189. Gomaa A, Hu H, Bellinger D, Schwartz J, Tsaih SW, Gonzalvo-Cossio T, Schnaas L, Peterson K, Aro A, Hernandez-Avila M. Maternal bone lead as an independent risk factor for fetal neurotoxicity: a prospective study.Pediatrics 2002;110: 110–118.
190. Rischitelli G, Nygren P, Bougatsos C, Freeman M, Helfand M. Screening for elevated lead levels in childhood and pregnancy: an updated summary of evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Pediatrics2006;118:1867–1895.
191. Goldhaber MK, Polen MR, Hiatt RA. The risk of miscarriage and birth defects among women who use video display terminals during pregnancy.Am J Ind Med, 1988;13:695–706.
192. AMA Council on Scientific Affairs. Effects of toxic chemicals on the reproductive system. JAMA 1985;253:3431–3437.
193. Levine F, Muenke F. VACTERL association with high prenatal lead exposure: similarities to animal models to lead teratogenicity. Pediatrics1991;87:390–392.
194. Murata K, Dakeishi M, Shimada M, Satoh H. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child development messages from the newborn. Tohoku J Exp Med 2007; 213:187–202.

195. Amin-zaki L, Majeed MA, Elhassani SB, Clarkson TW, Greenwood MR, Doherty RA. Prenatal methylmercury poisoning; clinical observations over five years. Am J Dis Child 1979;133:172–177.
196. Warkany J. Teratogen update: lithium. Teratology 1988;38:593–597.
197. Cohen LS, Friedman JM, Jefferson JW, Johnson EM, Weiner ML. A re-evaluation of risk of in utero exposure to lithium. JAMA 1994;271:146–150.
198. Jacobson SJ. Prospective multicentre study of pregnancy outcome after lithium exposure during first trimester. Lancet 1992;339:530–533.
199. Berkowitz RL. Handbook for Prescribing Medications During Pregnancy, 2nd ed, Little, Brown, Boston, 1986, pp 79.
200. Schou M. Occurrence of goiter during lithium treatment. Br Med J1968;3:710.
201. Beckman DA, Brent RL. Mechanism of teratogenesis. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1984;24:482–500
202. Costa LG, Guizzetti M, Burry M, Oberdoerster J. Developmental neurotoxicity: do similar phenotypes indicate a common mode of action? A comparison of fetal alcohol syndrome, toluene embryopathy and maternal phenylketonuria. Toxicol Lett 2002;127:197–205.
203. Arnold GL, Wilkens-Haug L. Toluene embryopathy syndromes. Am J Hum Genet 1990;47:A46.
204. Baeten JM, Bukusi EA, Lambe M. Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. Am J Public Health2001;91:436–440.
205. Stephansson O, Dickman PW, Johansson A, Chattingius S. Maternal weight, pregnancy weight gain, and the risk of antepartum stillbirth. Am J Obstet Gynecol 2001;184:463–469.
206. Sadler TW, Hunter ES III, Wynn RE, Phillips LS. Evidence for multifactorial origin of diabetes-induced embryopathies. Diabetes 1989;38:70–74.
207. Sadler TW, Denno KM, Hunger ES III. Effects of altered maternal metabolism during gastrulation and neurulation stages of embryogenesis.Ann NY Acad Sci 1993;678:48–61.
208. Miller E, Hare JW. Elevated maternal hemoglobin A1c in early pregnancy and major congenital anomalies in infants of diabetic mothers. NEJM1981;304:1331–1334.
209. Zhao Z, Reece EA. Experimental mechanisms of diabetic embryopathy and strategies for developing therapeutic interventions. J Soc Gynecol Invest2005;12:549–557.
210. Connolly KJ, Pharoah POD, Hetzel BS. Fetal iodine deficiency and motor performance during childhood. Lancet 1979;2:1149–1151.
211. Hetzel BS, Hay ID. Thyroid function, iodine nutrition, and fetal brain development. Clin Endocrinol 1979;11:445–460.
212. Kumar SP. Fetal alcohol syndrome, mechanisms of teratogenesis. Ann Clin Lab Sci 1982;12:254–257.
213. Jones KL. Smith's Recognizable Patterns of Human Malformations, 6th ed, Elsevier Saunders, Philadelphia, 2006; pp 491–494.
214. Trease GE, Evans WC. The pharmacological action of plant drugs. In: Pharmacognosy, 12th ed (Trease GE, Evans WC, Eds), Bailliere Tindall, London, 1983; pp 147–154.
215. Landesman-Dwyer S, Landesman-Dwyer IE. Smoking during pregnancy.Teratology 1979;19:119–125.
216. Naeye RL. Environmental influences on the embryo and early fetus. In: Disorders of the Placenta, Fetus and Neonate: Diagnosis and Clinical Significance (Naeye RL, Ed), Mosby-Year Book, St. Louis, 1989; pp 77–89.
217. Idanpaan-Heikkila J, Fritchie GE, Englert LF, Ho BT, McIsaac WM. Placental transfer of tritiated-1-tetrahydrocannabinol. NEJM1969;281:330.

218. Klausner HA, Dingell JV. The metabolism and excretion of delta-9-tetrahydocannabinol in the rat. Life Sci 1971;10:49–59.
219. Zellweger H, McDonald IS, Abbo G. Is lysergic-acid-diethyl-amide a teratogen? Lancet 1967;2:1066–1068.
220. Little BB. Cocaine abuse during pregnancy: maternal and fetal implications. Obstet Gynecol 1989;73:157–160.
221. Volpe JJ. Mechanisms of disease: effect of cocaine use on the fetus.NEJM 1992;327:399–407.
222. Garcia-Bournissen F, Tsur L, Goldstein LH, Stanoselsky A, Avner M, Asrar F, Berkovitch M, Straface G, Koren G, De Santis M. Fetal exposure to isotretinoin: an international problem. Reprod Toxicol 2008;1:124–128.
223. Wilhite CC. Isotretinoin-induced craniofacial malformations in humans and hamsters. J Craniofac Genet Dev Biol 1986; 2(suppl):193.
224. Teratology Society. Recommendations for vitamin A use during pregnancy.Teratology 1987;35:269.
225. Werler MM, Shaprio S, Mitchell AA. Periconceptional folic acid exposure and risk of occurrent neural tube defects. JAMA 1993;269:1257–1261.
226. Pauli RM. Mechanisms of bone and cartilage maldevelopment in the warfarin embryopathy. Pathol Immunopathol Res 1988; 7:107–112.
227. Brent RL, Beckman DA. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, an embryopathic class of drugs with unique properties: information for clinical teratology counselors. Teratology 1991;43:543–546
228. Lam, J.; Dohil, M. (2007). "Multiple Accessory Tragi and Hemifacial Microsomia". Pediatric Dermatology. 24 (6): 657–658.
229. Konaş, E.; Canter, H. I.; Mavili, M. E. (2006). "Goldenhar complex with atypical associated anomalies: Is the spectrum still widening?". The Journal of craniofacial surgery. 17 (4): 669–672.
230. Rapini, Ronald P.; Bolognia, Jean L.; Jorizzo, Joseph L. (2007). Dermatology: 2-Volume Set. St. Louis: Mosby. p. 1024.
231. Hartemink, David A.; Chiu, Yvonne E.; Drolet, Beth A.; Kerschner, Joseph E. (February 2009). "PHACES syndrome: a review". International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology. 73 (2): 181–7.
232. Haggstrom, AN; Garzon, MC; Baselga, E; Chamlin, SL; Frieden, IJ; Holland, K; Maguiness, S; Mancini, AJ; McCuaig, C; Metry, DW; Morel, K; Powell, J; Perkins, SM; Siegel, D; Drolet, BA (2010). "Risk for PHACE syndrome in infants with large facial hemangiomas". Pediatrics. 126 (2): e418–26.
233. Cancer hope over breast gene find", BBC, 1 September 2005; references the rate of extra nipples appearing in humans.
234. den Biggelaar, AM; Kuijpers-Jagtman, AM; Bergé, SJ; Katsaros, C (December 2006). ""Kabuki-syndroom, een congenitaal syndroom met multipele anomalieën (Kabuki syndrome, a congenital syndrome with multiple anomalies)". Nederlands Tijdschrift Voor Tandheelkunde". Ned Tijdschr Tandheelkd. 113 (12): 516–19
235. Levitsky G.A. 1924. The material basis of heredity. State Publication Office of the Ukraine, Kiev. [in Russian]
236. Levitsky G.A. (1931). "The morphology of chromosomes". Bull. Applied Bot. Genet. Plant Breed. 27: 19–174

237. Kottler M. 1974. From 48 to 46: cytological technique, preconception and the counting of the human chromosomes. Bull. Hist. Med. 48, 465-502.von Winiwarter H. 1912. Études sur la spermatogenese humaine. Arch. biologie 27, 93, 147-9.
238. Painter T.S. 1922. The spermatogenesis of man. Anat. Res. 23, 129.
239. Painter T.S. 1923. Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. J. Exp. Zoology 37, 291-336.
240. Tjio, J. H.A. Levan. The chromosome number in man. - Hereditas. 42, 1956, 1-6.
241. Lejeune, J., M. Gautier &R. Turpin. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]. - C R Hebd Seances Acad Sci. 248(11), 1959, 1721-1722.
242. Patau K, Smith DW, Therman E, Inhorn SL, Wagner HP (1960). "Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome". Lancet. 1 (7128): 790–3
243. Edwards, J. H., D. G. Harnden, A. H. Cameron, V. M. Crosse &O. H. Wolff. A new trisomic syndrome. - Lancet. 1(7128), 1960, 787-790.
244. Ford, C. E., K. W. Jones, P. E. Polani, J. C. De Almeida &J. H. Briggs. A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). - Lancet. 1(7075), 1959, 711-713.
245. Jacobs, P. A.J. A. Strong. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. - Nature. 183(4657), 1959, 302-303.
246. Renkema KY, Stokman MF, Giles RH et al: Next-generation sequencing for research and diagnostics in kidney disease. Nat Rev Nephrol. 2014;10(8):433-44.
247. Quail MA, Smith M, Coupland P et al: A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics. 2012;13(341.
248. Rehm HL, Bale SJ, Bayrak-Toydemir P et al: ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. Genet Med. 2013;15(9):733-47.
249. Grada A, Weinbrecht K: Next-generation sequencing: methodology and application. J Invest Dermatol. 2013;133(8):e11.
250. Bamshad MJ, Shendure JA, Valle D et al: The Centers for Mendelian Genomics: a new large-scale initiative to identify the genes underlying rare Mendelian conditions. Am J Med Genet A. 2012;158A(7):1523-5
251. Shen P, Wang W, Krishnakumar S et al: High-quality DNA sequence capture of 524 disease candidate genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(16):6549-54.
252. Speicher, M. R., S. Gwyn Ballard &D. C. Ward. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. - Nat Genet. 12(4), 1996, 368-375.
253. Schrock E, du Manoir S, Veldman T, Schoell B, Wienberg J, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. Science. 1996;273:494–497. doi: 10.1126/science.273.5274.494.
254. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar Da, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science 258:818-821.
255. Weiss M, Hermsen M, Meijer G, Van Grieken N, Baak J, Kuipers E, Van Diest P (1999) Comparative genomic hybridization. Molecular Pathology 52:243-251.
256. Veltman, J. A. Genomic microarrays in clinical diagnosis. - Curr Opin Pediatr. 18(6), 2006, 598-603.
257. Pinkel, D., et al., High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet, 1998. 20(2): p. 207-11.

258. Solinas-Toldo, S., S. Lampel, S. Stilgenbauer, J. Nickolenko, A. Benner, H. Dohner, T. Cremer &P. Lichter. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. - Genes Chromosomes Cancer. 20(4), 1997, 399-407
259. Koolen, D. A., L. E. Vissers, R. Pfundt, N. de Leeuw, S. J. Knight, R. Regan, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. - Nat Genet. 38(9), 2006, 999-1001.
260. Sharp, A. J., S. Hansen, R. R. Selzer, Z. Cheng, R. Regan, J. A. Hurst, et al. Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. - Nat Genet. 38(9), 2006, 1038-1042.
261. Shaw-Smith, C., A. M. Pittman, L. Willatt, H. Martin, L. Rickman, S. Gribble, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. - Nat Genet. 38(9), 2006, 1032-1037.
262. Vissers, L. E., J. A. Veltman, A. G. van Kessel &H. G. Brunner. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. - Hum Mol Genet. 14 Spec No. 2, 2005, R215-223.
263. Davies, J. J., I. M. Wilson &W. L. Lam. Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. - Chromosome Res. 13(3), 2005, 237-248.
264. Jonsson, G., T. L. Naylor, J. Vallon-Christersson, J. Staaf, J. Huang, M. R. Ward, et al. Distinct genomic profiles in hereditary breast tumors identified by array-based comparative genomic hybridization. - Cancer Res. 65(17), 2005, 7612-7621.
265. D'Amours, G., Z. Kibar, G. Mathonnet, R. Fetni, F. Tihy, V. Desilets, S. Nizard, J. L. Michaud &E. Lemyre. Whole-genome array CGH identifies pathogenic copy number variations in fetuses with major malformations and a normal karyotype. - Clin Genet. 2011
266. Evangelidou, P., C. Sismani, M. Ioannides, C. Christodoulou, G. Koumbaris, I. Kallikas, I. Georgiou, V. Velissariou &P. C. Patsalis. Clinical application of whole-genome array CGH during prenatal diagnosis: Study of 25 selected pregnancies with abnormal ultrasound findings or apparently balanced structural aberrations. - Mol Cytogenet. 3, 2010, 24.
267. Alfarawati, S., E. Fragouli, P. Colls &D. Wells. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. - Hum Reprod. 2011.
268. Fiorentino, F., L. Spizzichino, S. Bono, A. Biricik, G. Kokkali, L. Rienzi, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. - Hum Reprod. 2011.
269. Vermeesch, J. R., C. Melotte, G. Froyen, S. Van Vooren, B. Dutta, N. Maas, et al. Molecular karyotyping: array CGH quality criteria for constitutional genetic diagnosis. - J Histochem Cytochem. 53(3), 2005, 413-422.
270. Cheung, S. W., C. A. Shaw, D. A. Scott, A. Patel, T. Sahoo, C. A. Bacino, et al. Microarray-based CGH detects chromosomal mosaicism not revealed by conventional cytogenetics. - Am J Med Genet A. 143A(15), 2007, 1679-1686.
271. Comparative genomic hybridization on microarray (a-CGH) in constitutional and acquired mosaicism may detect as low as 8% abnormal cells. Roberto Valli,[1] Cristina Marletta,[1] Barbara Pressato,[1] Giuseppe Montalbano,[1] Francesco Lo Curto,[1] Francesco Pasquali,[1] and Emanuela Maserati, 2011
272. Rauch, A., J. Hoyer, S. Guth, C. Zweier, C. Kraus, C. Becker, et al. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. - Am J Med Genet A. 140(19), 2006, 2063-2074.

273. Kalscheuer, V. M., J. Tao, A. Donnelly, G. Hollway, E. Schwinger, S. Kubart, et al. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. - Am J Hum Genet. 72(6), 2003, 1401-1411.
274. Krebs, I., I. Weis, M. Hudler, J. M. Rommens, H. Roth, S. W. Scherer, et al. Translocation breakpoint maps 5 kb 3' from TWIST in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome. - Hum Mol Genet. 6(7), 1997, 1079-1086.
275. Ciccone, R., R. Giorda, G. Gregato, R. Guerrini, S. Giglio, R. Carrozzo, et al. Reciprocal translocations: a trap for cytogenetists? - Hum Genet. 117(6), 2005, 571-582.
276. Gribble, S. M., E. Prigmore, D. C. Burford, K. M. Porter, B. L. Ng, E. J. Douglas, et al. The complex nature of constitutional de novo apparently balanced translocations in patients presenting with abnormal phenotypes. - J Med Genet. 42(1), 2005, 8-16.
277. Higgins, A. W., F. S. Alkuraya, A. F. Bosco, K. K. Brown, G. A. Bruns, D. J. Donovan, et al. Characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements from the developmental genome anatomy project. - Am J Hum Genet. 82(3), 2008, 712-722. Schluth-Bolard, C., B. Delobel, D. Sanlaville, O. Boute, J. M. Cuisset, S. Sukno, et al. Cryptic genomic imbalances in de novo and inherited apparently balanced chromosomal rearrangements: array CGH study of 47 unrelated cases. - Eur J Med Genet. 52(5), 2009, 291-296.
278. Carter, N.P., Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. Nat Genet, 2007. 39(7 Suppl): p. S16-21.
279. Veltman, J.A. and B.B. de Vries, Diagnostic genome profiling: unbiased whole genome or targeted analysis? J Mol Diagn, 2006. 8(5): p. 534-7; discussion 537-9.
280. Diaz, E. and G.A. Barisone, DNA microarrays: sample quality control, array hybridization and scanning. J Vis Exp, 2011(49).
281. Zheng, Y., ChIP-on-chip for FoxP3. Methods Mol Biol, 2011. 707: p. 71-82.
282. Chen, H., et al., Genome-wide analysis of androgen receptor binding and gene regulation in two CWR22-derived prostate cancer cell lines. Endocr Relat Cancer, 2010. 17(4): p. 857-73.
283. Dhami, P., et al., Exon array CGH: detection of copy-number changes at the resolution of individual exons in the human genome. Am J Hum Genet, 2005. 76(5): p. 750-62.
284. Mantripragada, K.K., et al., Development of NF2 gene specific, strictly sequence defined diagnostic microarray for deletion detection. J Mol Med, 2003. 81(7): p. 443-51.
285. Schena, M., Microarray Manifacturing, in Microarray analysis. 2003, John Wiley&Sons: New Jersey. p. 159-197.
286. Ylstra, B., et al., BAC to the future! or oligonucleotides: a perspective for micro array comparative genomic hybridization (array CGH). Nucleic Acids Res, 2006. 34(2): p. 445-50.
287. Barrett, M.T., et al., Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(51): p. 17765-70.
288. Bunney, W.E., et al., Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. Am J Psychiatry, 2003. 160(4): p. 657-66.
289. (World Health Assembly report on birth defects).
290. (Global Strategy for Women's, Children's and Adolescents' Health, 2016-2030)
291. (United Nations Convention on the Rights of Persons with Disabilities).
292. Rio, M., et al., Automated fluorescent genotyping detects 10% of cryptic subtelomeric rearrangements in idiopathic syndromic mental retardation. J Med Genet, 2002. 39(4): p. 266-70.
293. Christelle Golzio, Jason Willer, Michael E Talkowski, Edwin C Oh, Yu Taniguchi, Sébastien Jacquemont, Alexandre Reymond, Mei Sun, Akira Sawa, James F Gusella, Atsushi Kamiya, Jacques S Beckmann, andNicholas Katsanis. KCTD13 is a major driver of mirrored

neuroanatomical phenotypes associated with the 16p11.2 CNV. Nature 2012 May 17; 485(7398): 363–367.
294. Sheth, K., et al., The behavioral characteristics of Sotos syndrome. Am J Med Genet A, 2015. 167(12): p. 2945-56.
295. Choufani, S., et al., NSD1 mutations generate a genome-wide DNA methylation signature. Nat Commun, 2015. 6: p. 10207.
296. Kurotaki, N., et al., Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: low copy repeats possibly mediate the common deletion. Hum Mutat, 2003. 22(5): p. 378-87.
297. Saugier-Veber, P., Bonnet, C., Afenjar, A., Drouin-Garraud, V., Coubes, C., Fehrenbach, S., Holder-Espinasse, M., Roume, J., Malan, V., Portnoi, M.-F., Jeanne, N., Baumann, C., and 9 others. Heterogeneity of NSD1 alterations in 116 patients with Sotos syndrome. Hum. Mutat. 28: 1098-1107, 2007.
298. Wulfsberg, E.A., Weaver, R.P., Cunniff, C.M., Jones, M.C., and Jones, K.L. Chromosome 10qter deletion syndrome: a review and report of three new cases. Am J Med Genet. 1989; 32: 364–367
299. Vera-Carbonell A[1], López-González V, Bafalliu JA, Ballesta-Martínez MJ, Fernández A, Guillén-Navarro E, López-Expósito I.Am J Med Genet A. 2015 Apr;167A(4):786-90. doi: 10.1002/ajmg.a.36949. Epub 2015 Feb 5.Clinical comparison of 10q26 overlapping deletions: delineating the critical region for urogenital anomalies.
300. Courtens, W., et al., A subterminal deletion of the long arm of chromosome 10: a clinical report and review. Am J Med Genet A, 2006. 140(4): p. 402-9.
301. Bellanne-Chantelot, C., Clauin, S., Chauveau, D., Collin, P., Daumont, M., Douillard, C., Dubois-Laforgue, D., Dusselier, L., Gautier, J.-F., Jadoul, M., Laloi-Michelin, M., Jacquesson, L., Larger, E., Louis, J., Nicolino, M., Subra, J.-F., Wilhem, J.-M., Young, J., Velho, G., Timsit, J.Large genomic rearrangements in the hepatocyte nuclear factor-1-beta (TCF2) gene are the most frequent cause of maturity-onset diabetes of the young type 5. Diabetes 54: 3126-3132, 2005.
302. Mefford, H. C., Clauin, S., Sharp, A. J., Moller, R. S., Ullmann, R., Kapur, R., Pinkel, D., Cooper, G. M., Ventura, M., Ropers, H. H., Tommerup, N., Eichler, E. E., Bellanne-Chantelot, C.Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. Am. J. Hum. Genet. 81: 1057-1069, 2007.
303. Nagamani, S. C., Erez, A., Shen, J., Li, C., Roeder, E., Cox, S., Karaviti, L., Pearson, M., Kang, S.-H. L., Sahoo, T., Lalani, S. R., Stankiewicz, P., Sutton, V. R., Cheung, S. W. Clinical spectrum associated with recurrent genomic rearrangements in chromosome 17q12. Europ. J. Hum. Genet. 18: 278-284, 2010.
304. Cheroki, C., Krepischi-Santos, A. C. V., Szuhai, K., Brenner, V., Kim, C. A. E., Otto, P. A., Rosenberg, C. Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. J. Med. Genet. 45: 228-232, 2008.
305. Bernardini, L., Gimelli, S., Gervasini, C., Carella, M., Baban, A., Frontino, G., Barbano, G., Divizia, M. T., Fedele, L., Novelli, A., Bena, F., Lalatta, F., Miozzo, M., Dallapiccola, B.Recurrent microdeletion at 17q12 as a cause of Mayer-Rokitansky-Kuster-Hauser (MRKH) syndrome: two case reports. Orphanet J. Rare Dis. 4: 25, 2009. Note: Electronic Article.
306. Moreno-De-Luca, D., et al., Deletion 17q12 is a recurrent copy number variant that confers high risk of autism and schizophrenia. Am J Hum Genet, 2010. 87(5): p. 618-30
307. Palumbo, P., et al., Variable phenotype in 17q12 microdeletions: clinical and molecular characterization of a new case. Gene, 2014. 538(2): p. 373-8.
308. Merico, D., et al., Whole-Genome Sequencing Suggests Schizophrenia Risk Mechanisms in Humans with 22q11.2 Deletion Syndrome. G3 (Bethesda), 2015. 5(11): p. 2453-61.

309. Hacihamdioglu, B., D. Hacihamdioglu, and K. Delil, 22q11 deletion syndrome: current perspective. Appl Clin Genet, 2015. 8: p. 123-32.
310. Mikhail, F. M., Burnside, R. D., Rush, B., Ibrahim, J., Godshalk, R., Rutledge, S. L., Robin, N. H., Descartes, M. D., Carroll, A. J. The recurrent distal 22q11.2 microdeletions are often de novo and do not represent a single clinical entity: a proposed categorization system. Genet. Med. 16: 92-100, 2014.
311. 15q Duplication Syndrome and Related Disorders Brenda M Finucane, MS, LGC, Laina Lusk, BS, Dimitrios Arkilo, MD, Stormy Chamberlain, PhD, Orrin Devinsky, MD, Scott Dindot, PhD, Shafali Spurling Jeste, MD, Janine M LaSalle, PhD, Lawrence T Reiter, PhD, N Carolyn Schanen, MD, PhD, Sarah J Spence, MD, PhD, Ronald L Thibert, DO, MSPH, Guy Calvert, DPhil, Kadi Luchsinger, BS, PT, and Edwin H Cook, MD.2016г
312. Kalsner, L. and S.J. Chamberlain, Prader-Willi, Angelman, and 15q11-q13 Duplication Syndromes. Pediatr Clin North Am, 2015. 62(3): p. 587-606..
313. Tan, E.S., et al., Chromosome 15q11-q13 copy number gain detected by array-CGH in two cases with a maternal methylation pattern. Mol Cytogenet, 2014. 7: p. 32
314. Puffenberger EG, Jinks RN, Wang H, Xin B, Fiorentini C, Sherman EA, Degrazio D, Shaw C, Sougnez C, Cibulskis K, Gabriel S, Kelley RI, Morton DH, Strauss KA. A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. Hum Mutat. 2012;33:1639–46.
315. Harlalka GV, Baple EL, Cross H, Kühnle S, Cubillos-Rojas M, Matentzoglu K, Patton MA, Wagner K, Coblentz R, Ford DL, Mackay DJ, Chioza BA, Scheffner M, Rosa JL, Crosby AH. Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features. J Med Genet. 2013;50:65–73
316. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., Mandel, J. L. A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. Proc. Nat. Acad. Sci. 98: 8844-8849, 2001.
317. McCarroll, S.A. and D.M. Altshuler, Copy-number variation and association studies of human disease. Nat Genet, 2007. 39(7 Suppl): p. S37-42.
318. Diskin, S.J., et al., Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. Nature, 2009. 459(7249): p. 987-91.
319. Kooy, R.F., Distinct disorders affecting the brain share common genetic origins. F1000 Biol Rep, 2010. 2.
320. Wellcome Trust Case Control Consortium, et al., Genome-wide association study of CNVs in 16,000 cases of eight common diseases and 3,000 shared controls. Nature, 2010. 464(7289): p. 713-20.
321. Koolen, D. A., , Kramer, J. M., Neveling, K., Nillesen, W. M., Moore-Barton, H. L., Elmslie, F. V., Toutain, A., Amiel, J., Malan, V., Tsai, A. C.-H., Cheung, S. W., Gilissen, C., and 13 others.Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. Nature Genet. 44: 639-641, 2012.
322. Zollino, M., Orteschi, D., Murdolo, M., Lattante, S., Battaglia, D., Stefanini, C., Mercuri, E., Chiurazzi, P., Neri, G., Marangi, G. Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. Nature Genet. 44: 636-638, 2012.

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

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

Дата: ..... Подпис: .....

гр. София /Марта Михайлова/