



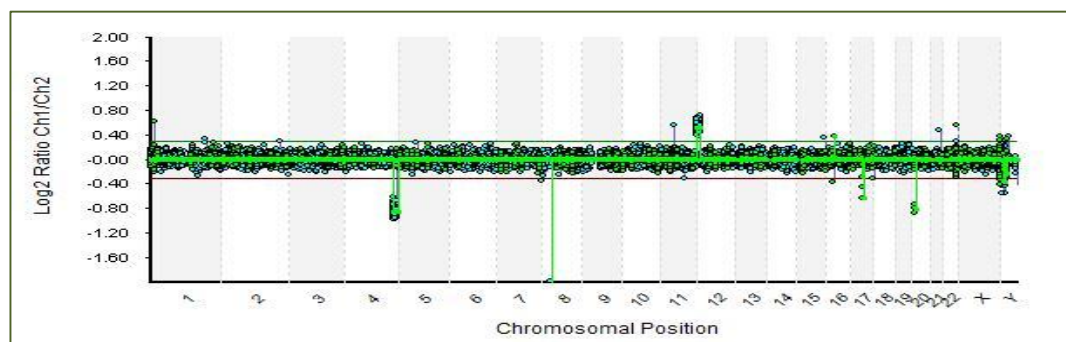
МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ



КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

---

**д-р МАРТА ГРИГОРОВА МИХАЙЛОВА**  
**ВАРИАЦИИ В БРОЯ КОПИЯ ПРИ ДЕЦА С НАРУШЕНИЯ В**  
**РАЗВИТИЕТО**



**А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд 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”

---

София, 2017 г.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

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

---

Д-Р МАРТА ГРИГОРОВА МИХАЙЛОВА

**Вариации в броя копия при деца с нарушения в развитието**

## **А В Т О Р Е Ф Е Р А Т**

на дисертационен труд 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

---

София, 2017



Изследванията са извършени в Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертацията съдържа 147 стандартни страници и включва 26 фигури и 8 таблици. Оформена е в 7 глави, заключение, изводи, приноси, литературни източници и декларация за оригиналност. Библиографията обхваща 322 източника.

Докторантът е задочен докторант към Катедра по Медицинска генетика, Медицински Факултет, Медицински Университет – София.

Дисертационният труд е обсъден на разширен Катедрен съвет в Катедрата по Медицинска генетика към Медицински Факултет, Медицински Университет – София на 24.02.2017 г. и е насочен за защита пред Научно жури.

Материалите по защитата са на разположение в Катедрата по Медицинска генетика, 6-ти етаж на СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. „Здраве”2, София, 1431.

Защитата ще се състои на 18.05.2017 год. от 13.00 часа в семинарна зала, етаж 14 на СБАЛАГ „Майчин дом”, ул. „Здраве”2, София, 1431.

**Автор:** д-р Марта Григорова Михайлова

**Заглавие:** Вариации в броя копия при деца с нарушения в развитието

**Област на висше образование:** „Здравеопазване и спорт”, шифър 4.

**Професионално направление:** „Биологични науки”, шифър 4.3.

**Научна специалност:** „Генетика”

<b>1</b>	<b>Съдържание</b>	
<b>2</b>	<b>Въведение</b>	1
<b>3</b>	<b>Цел и задачи</b>	2
3.1	Цел	2
3.2	Задачи	2
<b>4</b>	<b>Материали и методи</b>	3
4.1	Участници в проучването	3
4.2	Биологични проби	3
4.3	Използвани методи	3
<b>5</b>	<b>Резултати</b>	9
5.1	Подбор на пациенти	9
5.1.1	Патологични вариации в броя копия	10
5.1.2	Нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	18
<b>6</b>	<b>Обсъждане</b>	19
6.1	Обсъждане на установените патологични CNVs в търсене на генотип-фенотипни корелации.	20
6.2	Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение	30
6.2.1	Нормални вариации в броя копия	31
6.2.2	Вариации в броя копия с неясно клинично значение	33
6.3	Обсъждане на вероятно нормалните вариации в броя копия	34
6.3.1	Вариации с неясно клинично значение	34
6.3.2	Патологични вариации	36
6.4	Обобщение на честотите на вариациите в броя копия след интерпретацията на резултатите.	36
<b>7</b>	<b>Заключение</b>	37
<b>8</b>	<b>Изводи</b>	39
<b>9</b>	<b>Приноси</b>	41
<b>10</b>	<b>Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд ...</b>	42
<b>11</b>	<b>Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд.....</b>	42
<b>12</b>	<b>Благодарности</b>	43
<b>13</b>	<b>Summary</b>	44

## Използвани в текста съкращения

### Съкращения на кирилица

<b>БХС</b>	- биохимичен скрининг
<b>ВА</b>	- вродени аномалии
<b>ГДП</b>	- горни дихателни пътища
<b>ДНК</b>	- дезокси - рибонуклеинова киселина
<b>ДНТ</b>	- дефекти на невралната тръба
<b>ДС</b>	- дихателна система
<b>ДЧ</b>	- дихателна честота
<b>ЕЕГ</b>	- електроенцефалограма
<b>ЕМГ</b>	- електромиография
<b>ЕхоКГ</b>	- ехокардиография
<b>ИН</b>	- интелектуална недостатъчност
<b>КГДП</b>	- катар на горни дихателни пътища
<b>КТ</b>	- компютърна томография
<b>НПР</b>	- невропсихично развитие
<b>НС</b>	- нервна система
<b>ОДС</b>	- опорно-двигателна система
<b>ПМТ</b>	- подкожна мастна тъкан
<b>ПД</b>	- пренатална диагностика
<b>СГХ</b>	- сравнителна геномна хибридизация
<b>СЗО</b>	- Световна Здравна Организация
<b>ССС</b>	- сърдечно-съдова система
<b>ТФЕ</b>	- трансфонтанелна ехография
<b>УЗ</b>	- ултразвук
<b>ХА</b>	- хромозомна аберация
<b>ЦНС</b>	- централна нервна система

### Съкращения на латиница:

<b>array CGH</b>	- array-based Comparative Genomic Hybridization (микрочипова сравнителна геномна хибридизация)
<b>bp</b>	- <u>B</u> ase <u>P</u> airs (базова двойка)
<b>CGH</b>	- <u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization (сравнителна геномна хибридизация)
<b>CNVs</b>	- <u>C</u> opy <u>N</u> umber <u>V</u> ariations (вариации в броя копия)
<b>Cy3</b>	- <u>C</u> yanine <u>3</u> (цианин 3)
<b>Cy5</b>	- <u>C</u> yanine <u>5</u> (цианин 5)
<b>DGV</b>	- <u>D</u> atabase of <u>G</u> enomic <u>V</u> ariants (база данни на геномните варианти)
<b>EDTA</b>	- <u>E</u> thylene <u>D</u> iamine <u>T</u> etraacetic <u>A</u> (етилен диамино-тетраоцетна киселина)
<b>FISH</b>	- <u>F</u> luorescent <u>i</u> n <u>S</u> itu <u>H</u> ybridization,
<b>Kb</b>	- <u>K</u> ilobase (килобаза)
<b>LCRs</b>	- <u>L</u> ow <u>C</u> opy-number <u>R</u> epeats (ниско-повторени копия)
<b>Mb</b>	- <u>M</u> egabase (мегабаза)
<b>MLPA</b>	- <u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation-dependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification

<b>NGS</b>	- Next-Generation Sequencing
<b>QC</b>	- <u>Q</u> uality <u>C</u> ontrol (качествен контрол)
<b>QF-PCR</b>	- <u>Q</u> uantitative <u>F</u> luorescence <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
<b>SBR</b>	- <u>S</u> ignal to <u>B</u> ackground <u>R</u> atio (съотношение на интензитета на сигнала към фоновия шум)
<b>SD</b>	- <u>S</u> tandard <u>D</u> eviation (стандартно отклонение)
<b>SG</b>	- <u>S</u> pectrum <u>G</u> reen (зелен спектър)
<b>SO</b>	- <u>S</u> pectrum <u>O</u> range (оранжев спектър)
<b>SSC</b>	- <u>S</u> aline- <u>S</u> odium <u>C</u> itrate (солеви натриев цитрат)

**Забележка:** Номерата на таблиците и фигурите не съответстват на номерата в дисертационния труд.

## 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 заболяемост. 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) заедно с цитогенетичните методи, се диагностицираха широк спектър от заболявания. Методите са с по-висока резолуция, 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 резолуцията зависи от размера и гъстотата на фиксираните клонове. Технологията позволява цялостен геномен скрининг с висока резолуция 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. 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 ѝ труд. 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 Цел и задачи**

---

#### **3.1 Цел**

Целта на настоящата дисертация 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.

#### **3.2 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.

## 4 Материали и методи

---

### 4.1 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. 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.

### 4.2 Биологични проби

При спазване на стандартните процедури за стерилност, от всеки пациент е взета венозна кръв за изолирането на ДНК с последващо събиране на материала във вакутейнери с EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) (4 ml). Кръвта е вземана до час след нахранване и е съхранявана на +4°C до транспортирането ѝ 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 -20°C 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.

### 4.3 Използвани методи

В изследователския 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.

#### 4.3.1 Олигонуклеотидни микрочипове

Използвани са 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.

### 4.3.1.1 Техника

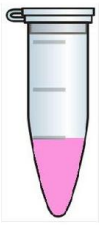
Техниката включва няколко основни етапа - 1) подготовка на пробата; 2) белязване; 3) пречистване и комбиниране на белязаните проби; 4) хибридизация; 5) промиване; 6) скениране на микрочиповете; 7) софтуерен анализ на данните.

**Подготовка на пробата.** Използва се разтворена в ТЕ буфер високомолекулна ДНК от порядъка на 10-20 Kb, със съотношение на чистота за протеини и РНК в границите между 1.8-2.0 при дължина на вълната OD 260/280 и със съотношение за органични разтворители при OD 260/230 > 2.0. При наличие на замърсяване, пробите се пречистват с помощта на протеиназа К и повторно преципитират. Тестваните ДНК на пациентите и контролните ДНК-и се разреждат със свободна от нуклеази дестилирана H<sub>2</sub>O 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 dH<sub>2</sub>O. 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).** (Табл. 1).

Компоненти	Су3 смес за белязване на 8 реакции	Су5 смес за белязване на 8 реакции
5xРеакционен буфер		
10xdNTP - смес за белязване	85 μl	85 μl
Су3dUTP	42.5 μl	42.5 μl
Су5 dUTP	25.5 μl	25.5 μl
Ехо-Klenow ензим	8.5 μl	8.5 μl
Общо	161.5 μl	161.5 μl
За 1 реакция	19 μl	19 μl

**Таблица 1.** Необходими реактиви за белязване на 16 реакции за олиго-микрочипов анализ.

dNTP - Деоxyрiboнucleotides Тriphosphate (дезоксирибонуклеотид трифосфат)

dUTP - Deoxyuridine Triphosphate (деоксиуридин трифосфат)

**Смесване на ДНК-те със сместа за белязване.** Във всяка епруветка, съдържаща ДНК и праймери (общ обем 31  $\mu$ l) се добавят по 19  $\mu$ l от сместа за белязване, като тестваната ДНК се смесва със Су3, а контролната ДНК със Су5 до краен обем 50  $\mu$ l. 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  $\rightarrow$  10 min на 65°C  $\rightarrow$  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  $\mu$ l филтриран 1x TE буфер (краен обем 480  $\mu$ l).

**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  $\mu$ l филтриран 1x TE буфер и отново се центрофугират 10 min на 14 000 G. Пречистената ДНК се задържа във филтъра, поради което той се обръща на 180° в чиста епруветка и се центрофугира 1 min на 1000 G. Интересуващата ни ДНК се утаява на дъното на епруветката.

- **Определяне на обема на пречистените проби.** Количеството на пречистената ДНК се измерва с помощта на пипета, като варира около 21  $\mu$ l. Добавя се 1xTE буфер за получаване на краен обем от 41  $\mu$ l.

- **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-2000с, като се използват по 2  $\mu$ l от всяка проба. Белязането се приема за успешно, ако концентрацията, инкорпорацията и чистота на пробата са в следните граници:

- ✓ Концентрация на ДНК: 100 - 200 ng/ $\mu$ l;
- ✓ Инкорпорация на багрилото: 4 - 8 pmol/ $\mu$ l;
- ✓ Чистота на пробата при 260/280 nm: 1,8 – 2.

**Комбинация на пробите с тествана и контролна ДНК.** Всяка тест ДНК, белязана със Су3 се комбинира със Су5-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 свързване.

**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 СОТ 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.** Микрочиповете 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 2:

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

**Стопирание 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.

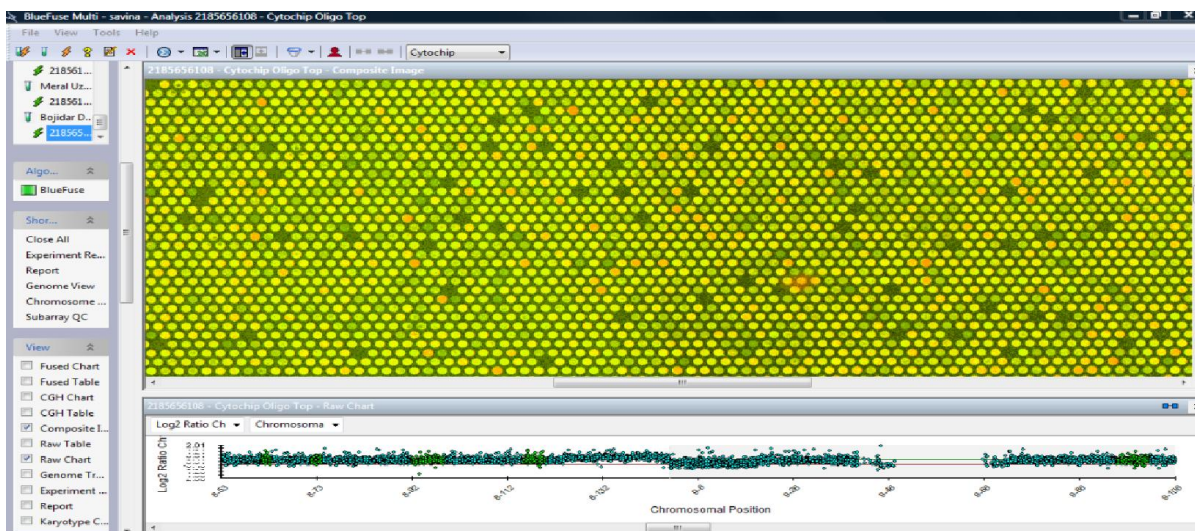
**Съхранение.** Микрочиповете могат да се съхраняват за определено време с помощта на покривни стъкла с бариера за озона в оригиналната им кутийка на тъмно и сухо място.

## Скениране на микрочиповете.

**Прескениране.** По време на прескенирането при резолюция от порядъка на 50  $\mu\text{m}$  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.

**Скениране.** 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 5  $\mu\text{m}$ . 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.

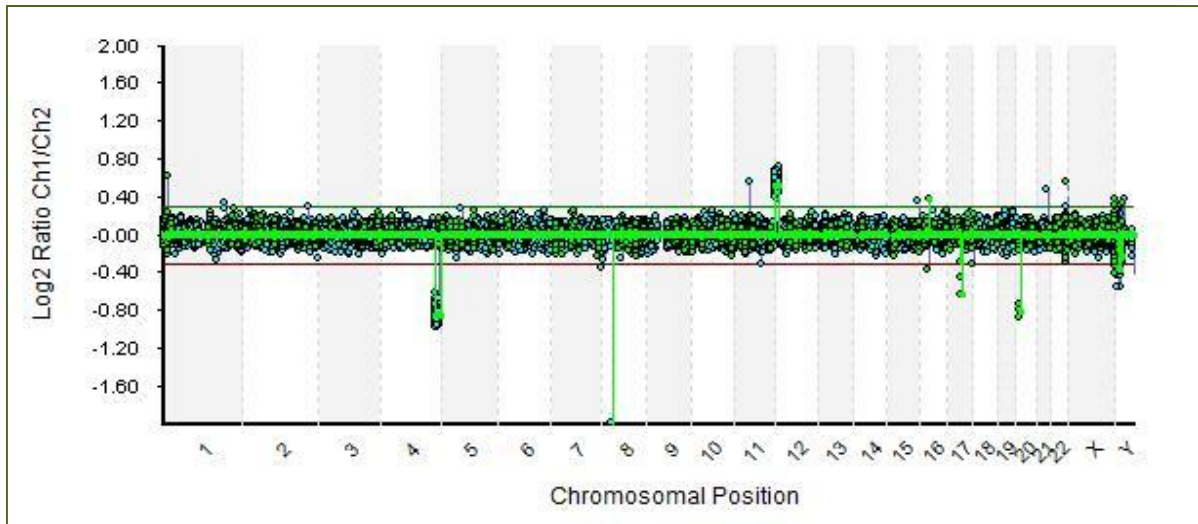
**Софтуерен анализ на данните.** Всички данни са обработени с програма BlueFuse Multi version 4.2.(20289), (BlueGnome, Cambridge) (Фиг. 1). При анализа репликите на чипа се дефинират автоматично от софтуера. Флуоресцентните интензитети на всички реплики се калкулират след автоматично елиминиране на локалния 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 1.** 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 Су3 белязаните клонове, съобразно позицията им в микрочипа.  $\text{Log}_2$  - 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. 2).



**Фигура 2.** ДНК профил с едновременно наличие на дупликация 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  $\text{log}_2$  съотношението на интензитетите на флуоресценция. То отразява степента на разлика между съседни олигонуклеотидни клонове. По принцип два съседно разположени клона в повечето случаи трябва да имат много сходни съотношения, напр. ако са нормални те ще са с 1:1 съотношение. Увеличаването на стойността на DLR показва увеличаване на разликата между два съседни олиго клона.

- DLR fused (Derivative log Ratio fused)

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

- SD на автозомите

Референтни граници 0.07-0.17. SD отразява разпределението на  $\text{log}_2$  съотношенията на всички клонове от чипа, върху нормализирани, но не обработени данни.

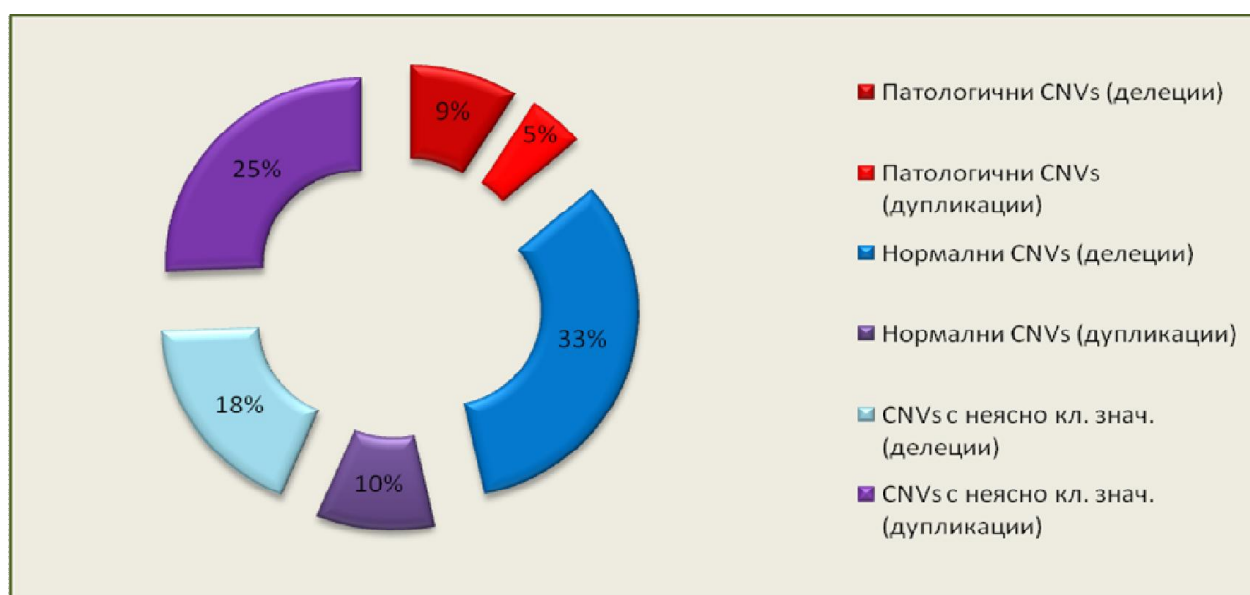
- SBR

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

## 5 Резултати

### 5.1 Подбор на пациенти

Подборът на пациенти с вродени аномалии е проведен от специалисти педиатри и генетици в клинична обстановка, като вродените дефекти бяха в съчетание или не с когнитивен дефицит, поведенчески проблеми, изоставане в нервно-психичното развитие, задържане на растежа и други нарушения от страна на ЦНС и други органи и системи. 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 (28 делеции, 13 дупликации), 118 нормални (91 делеции, 27 дупликации) и 121 с неясно клинично значение (50 делеции, 71 дупликации) (Фиг.3)



**Фигура 3.** 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: агг 4q34.3q35.2(178,213,959-190,896,645)x1.

### 5.1.1 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 3). При 7 от аберациите се касае за делетиран генетичен материал, а при 2 за дублициран. 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 3.** Пациенти и патологични находки асоциирани с фенотипа им.

Пациенти	Хромо-зома	Тип аберация	Позиция в bp		Размер (bp)	Цитолента	
			Начало	Край		Начало	Край
Пац. 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
Пац. 52	10	делеция	122,804,780	135,434,149	12,629,370	10q26.12	10q26.3
Пац. 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
Пац. 41	17	делеция	34,450,435	36,248,889	1,798,455	17q12	17q12
Пац. 35	22	делеция	21,561,492	22,905,039	1,343,548	22q11.21	22q11.22
Пац. 30	15	дупликация	22,765,658	29,030,488	6,264,831	15q11.2	15q13.1
Пац. 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 4).

**Таблица 4.** Пациенти и патологични находки неасоциирани с характерният им фенотип.

Пациенти	Хромо-зона	Тип аберация	Позиция в bp		Размер (bp)	Цитолента	
			Начало	Край		Начало	Край
Пац. 44	7	дупликация	115,099,099	116,966,889	1,867,791	7q31.2	7q31.2
Пац.50	9	дупликация	120,022,793	121,547,117	1,524,325	9q33.1	9q33.1
Пац. 2	16	делеция	28,861,561	29,031,030	169,47	16p11.2	16p11.2
Пац. 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.

#### 5.1.1.1 Представяне на пациентите с патологични вариации асоциирани с фенотипа.

##### Пациент 79 - 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.

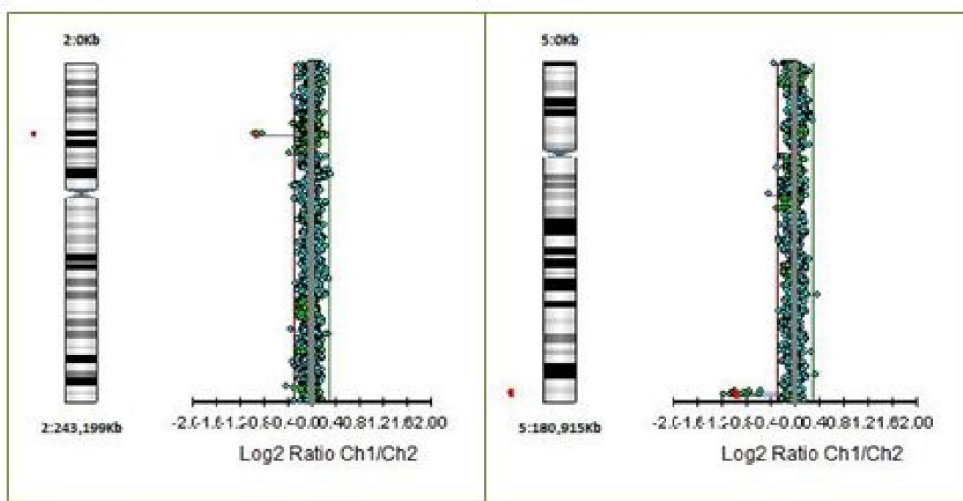
➤ **Статус:** Тегло 8500 гр. (SDS=-1,49), ръст 77 см (SDS=-0,03), обиколка на глава 49 см (SDS= 1,2). Кожа – мургава, редуцирана подкожна мастна тъкан (ПМТ). Долихоцефалия, лицев дисморфизъм: продълговато лице с проминиращо чело, ретрогнатия, депресия в основата на носа, антимонголоидни очни цепки, хипертелоризъм, 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

гърдният 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.

### 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.

arg 2p16.3p16.3(50,982,143-51,314,401)x1; 5q35.2q35.3(175,470,501-177,136,261)x1 (Табл. 3, Фиг. 4).



**Фигура 4.** 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).

### Пациент 52 - 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.

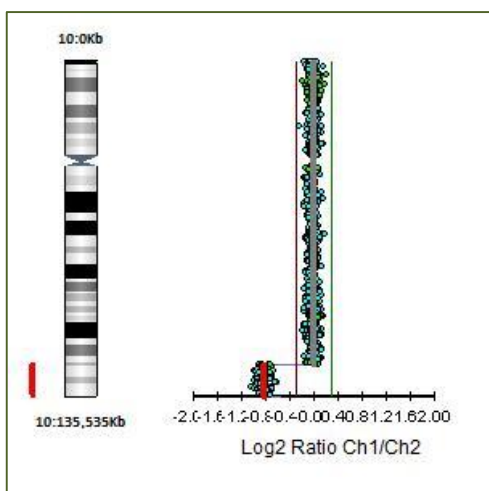
➤ **Статус:** Тегло- 3160кг (SDS= - 3,99), ръст - 54см (SDS= - 2,39), обиколка на глава- 36см (SDS= - 3,43). Кожа- розова, запазени тургор и еластичност. Периферни лимфни възли (ПЛВ) - не се палпират увеличени. Фациес – дисморфичен, лек хипертелриръм, тънки устни, ниско разположени дисморфични ушни миди, широка основа на носа, изпъкнали фронтални тубери. Глава – поизпъкнала 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.

### 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. 3, Фиг. 5).



**Фигура 5.** Резултат от микрочиповия анализ на Пациент 52 – делеция в хромозома 10, del(10)(q26.12q26.3)

### Пациент 46 - 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 субарахноидалните 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.

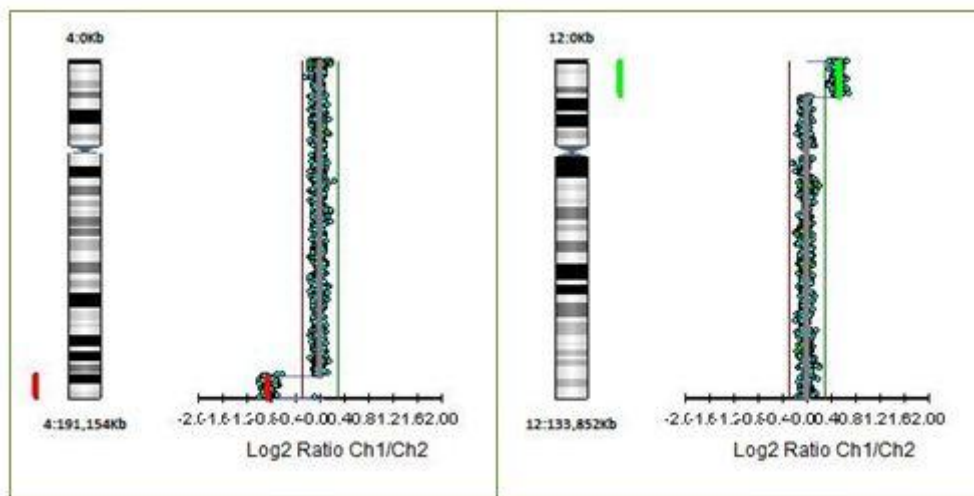
➤ **Статус:** Тегло 34 кг (SDS = 1.71), ръст 123.5 см (SDS = -0.04), обиколка на глава 54.5 см (SDS = 2.22). Кожа с добър тургор и еластичност. ПМТ – изразена по торса. Долихоцефалия, лицев дисморфизъм: продълговато лице с битемпорално стеснение, изгладени супраорбитални дъги, антимоноглоидни очни цепки, 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.

### 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. 3, Фиг. 6).



**Фигура 6.** 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).

### Пациент 41 - 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, трансaminaзи, 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 Инфекционна 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

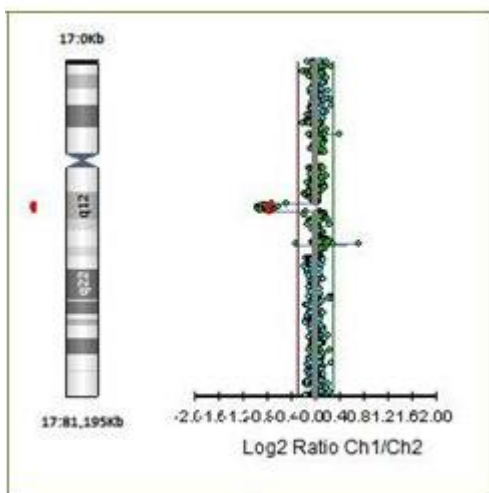
изоставане в съзряването на коровата електрогенеза, без пароксизмална абнормност. Казва отделни думи. Посещава дневен център.

➤ **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, меко-еластичен, 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, *res varus*, абнормни дерматоглифи на дясна ръка, *rectus excavatum*. Леко понижен мускулен тонус.

### 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. 3, Фиг. 7).



**Фигура 7.** Резултат от микрочиповия анализ на Пациент 41 – делеция в хромозома 17 - *del(17)(q12)*.

### Пациент 35 - 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

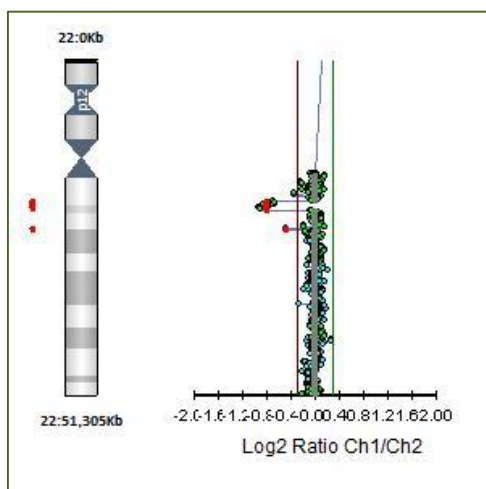
околоплодни води. След този период е регистрирано изоставане в растежа на плода. Раждането е настъпило 12 дни преди термин чрез цезарово сечение, с тегло 1900 грама, дължина 44 см, обиколка на главата 33 см, APGAR 1' – 6, на 5' - 6. На едномесечна възраст е направена консултация, и е потвърдена лекостепенна 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.

### 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.

$arr\ 22q11.21q11.22(21,561,492-22,905,039)\times 1$  (Табл. 3, Фиг. 8).



**Фигура 8.** Резултат от микрочиповият анализ на пациент 35 – делеция в хромозома 22 -  $del(22)(q11.21q11.22)$ .

### Пациент 30 - Клиничен фенотип

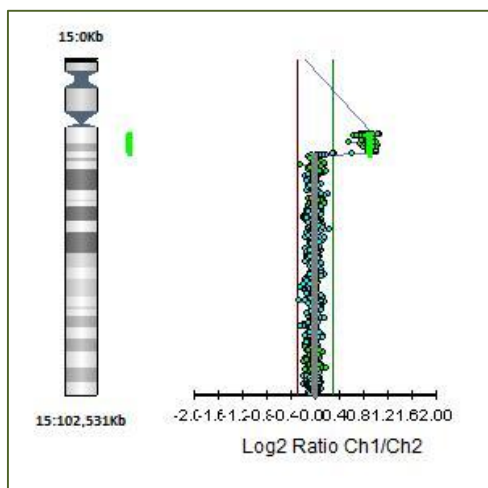
➤ **Анамнеза:** Момче на 5 г от първа патологично протекла бременност, с контракции през V-VI м.л., родено чрез секцио, с тегло 3550 гр., дължина 53 см., обиколка на главата 35 см. Регистрирани проблеми в храненето, понижен мускулен тонус, по-изразен за аксиална мускулатура, бързо изчерпващ се сукателен рефлекс. Поради изоставане в НПП за първи път е хоспитализиран на 1 г.3 м. Rö-графия на череп фас и профил: частична краниостеноза. Седи без подкрепа от 1 г.3 м, проходил след 2 г.6 м., 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, енофталам, 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- rectus excavatum, ставен хиперфлексибилитет, леко понижен мускулен тонус.

### 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. 3, Фиг. 9).



**Фигура 9.** Резултат от микрочиповият анализ на пациент 30 – дупликация на хромозома 15 - dup(15)(q11.2q13.1)

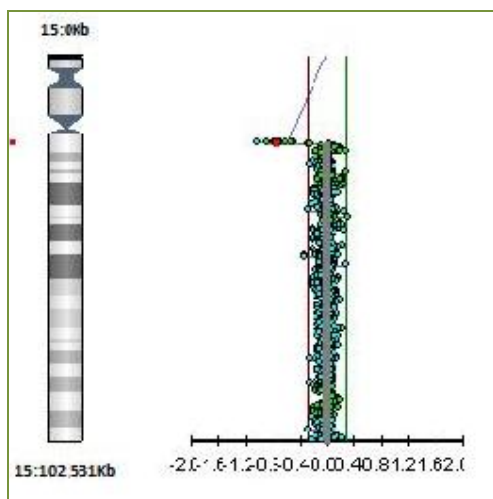
### Пациент 24 - Клиничен фенотип

➤ 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.

### 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. 3, фиг.10)



**Фигура 10.** Резултат от микрочиповият анализ на пациент 24 – делеция в хромозома 15 - del(15)(q11.2).

### 5.1.2 Нормални CNVs и CNVs 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. 4).

**Таблица 4.** 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.

## 6 Обсъждане

Обсъждането на резултатите от микрочиповия ДНК анализ може схематично и опростено да бъде представено както следва от фигура 11.



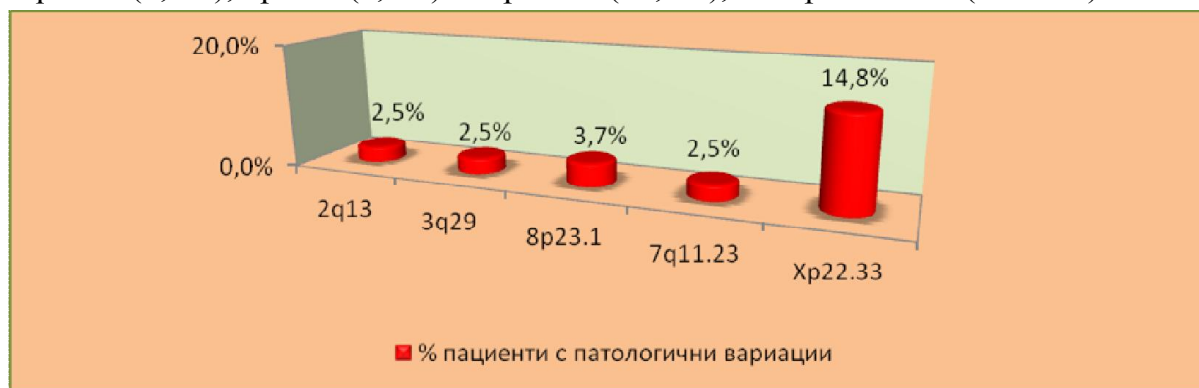
**Фигура 11.** Схематично представяне на алгоритъм за анализ на резултати от микрочипов анализ.

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

### 6.1 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. 12).



**Фигура 12.** 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 predisпозиция към социално-значими заболявания и евентуално прекласифициране.

#### **6.1.1 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** и **8 OMIM**. 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.

#### **6.1.2 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), с 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 клиничния 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.

#### **6.1.3 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** и **6 OMIM** гена. 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 синусит, имунен дефицит, Brody миопатия, когнитивни дефекти, аутизъм, епилепсия. Основният обсъждан кандидат ген свързан с аутизъм, когнитивен спад, епилепсия е *KCTD13* (potassium channel tetramerization domain containing-13) генът, който не е обхванат от аберацията на пациента. 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** и **1 OMIM** 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.

#### **6.1.4 Генотип-фенотипни корелации на патологична находка при пациент 53 – arr 3q26.32 (177,889,843-179,472,535)x1**

Микрочиповият ДНК анализ разкрива делеция в хромозома 3 - del(3)(q26.32). Аберацията е над 1Mb. Делецията обхваща **14 HGNC** и **10 OMIM** 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**

#### **6.1.5 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** и **24 OMIM** гена

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 - височина 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 резултат от мутации в *NSDI* гена. Описани са повече от 100 патологични варианта на този ген. Други генетични причини за момента не са установени.

*NSDI* 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. *NSDI* протеинът контролира активността на гени, свързани с нормалния растеж и развитие, въпреки че голяма част от тези гени не са идентифицирани<sup>295</sup>

При тестване на 234 лица със Sotos синдром, се установява, че пациентите с *NSDI* 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 *NSDI*. В японското население е докладвана микроделеция от 1.9 Mb на хромозома 5, обхващаща *NSDI* при индивиди със синдром на Sotos. Голяма част от микроделециите са генерирани чрез неалелна хомоложна рекомбинация между фланкиращи нископовторени последователности<sup>296</sup>. При други популации са почети мутациите в рамките на самия ген.

При проучване на Saugier-Verber и др. (2007) са идентифицирани 69 различни точкови мутации, включително 48 нови мутации, в гена *NSDI* в 104 пациенти от 102 семейства със синдром на Sotos. Точкови мутации са открити в 80%, големи делеции водещи до липса на гена *NSDI* - в 14%, а вътрегенни пренареждания в 6%. Големите делеции варирали от 1 до 4.5 Mb. Пациентите с нонсенс мутации водещи до 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. Намаленото количество на *NSDI* 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.

### 6.1.6 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** и **49 OMIM гена**

Съществуването на 10q-делеционният 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. 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 постнаталното 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. 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, медиращ 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 *DRDIIP* (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 медиращи паметта и обучението.

#### **6.1.7 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 и 21 OMIM гена**. Дупликацията е патологична и покрива **226 HGNC и 156 OMIM гена**.

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-макроглобулинен 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 затруднена от еднакъв размер на транслоцираните сегменти.

#### **6.1.8 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** и **24 OMIM гена**

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. До подобни заключения стигат и Mefford и колеги.

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.

**Мюлерова аплазия / дисгенезия и асоциираните разстройства** – в няколко проучвания се разкрива връзката на 17q12 делецията Mayer-Rokitansky-Küster-Hausler (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 Cherokee и сътр. (2008) и Bernardini и сътр. (2009).

**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. 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.

#### **6.1.9 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** и **12 OMIM гена**.

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.

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. Трина 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.

#### **6.1.10 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** и **16 OMIM** гена.

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 инфантни 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. Честотата на синдрома е 1 на 30 000 новородени, като съотношението между двата пола е почти 1:1.

Според Тап и сътр. с развитието на ЦНС са свързани най-малко три гена - *NIPAI*, *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, медиращи основния невротрансмитер с инхибиторни функции в мозъка – GABA. *HERC2* е друг важен ген кодиращ Е3 убиквитин лигаза. Индивидите с аберации обхващащи този ген могат да имат интелектуална недостатъчност или тежка форма на синдром на Ейнджълман.

#### **6.1.11 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** и **4 OMIM** 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 аутистичния 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<sup>316</sup>. Както беше споменато и при предишния пациент, гените *NIPAI*, *NIPA2* имат роля в развитието на нервната система.

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.

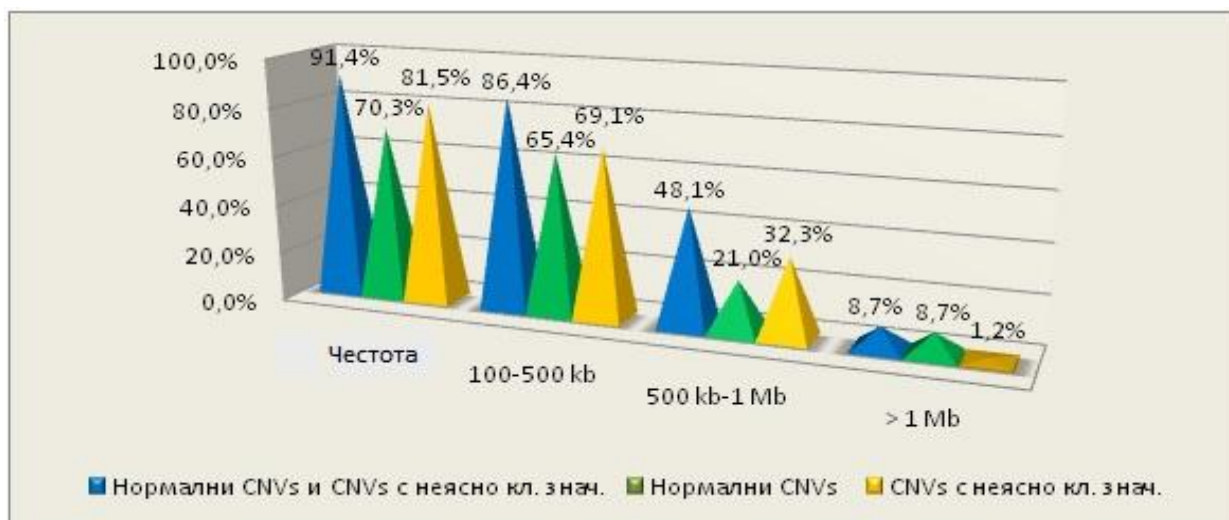
## 6.2 Обсъждане на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение

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, 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.

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 дубликации. 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. 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%<sup>100</sup>.

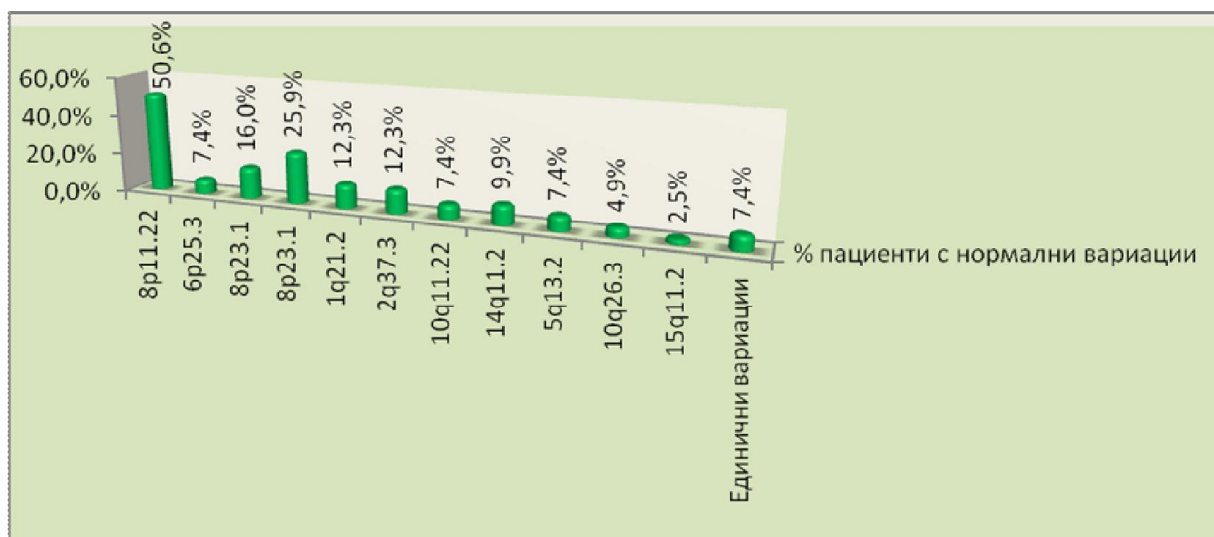
Нашите резултати идентифицират честоти на установените нормални CNVs и CNVs с неясно клинично значение при изследваните лица както следва: CNVs с размер 100 kb – 500 kb са установени при 86,4% (70 пациенти), варианти с размер 500 Kb - 1 Mb - при 48,1% (39 пациенти) и CNVs с размер над 1 Mb - при 8,6% (7 пациенти) (Фиг. 13). 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 13.** Честота на установените нормални вариации и вариации с неясно клинично значение в изследваната група, разпределени по размер.

### 6.2.1 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. 14).

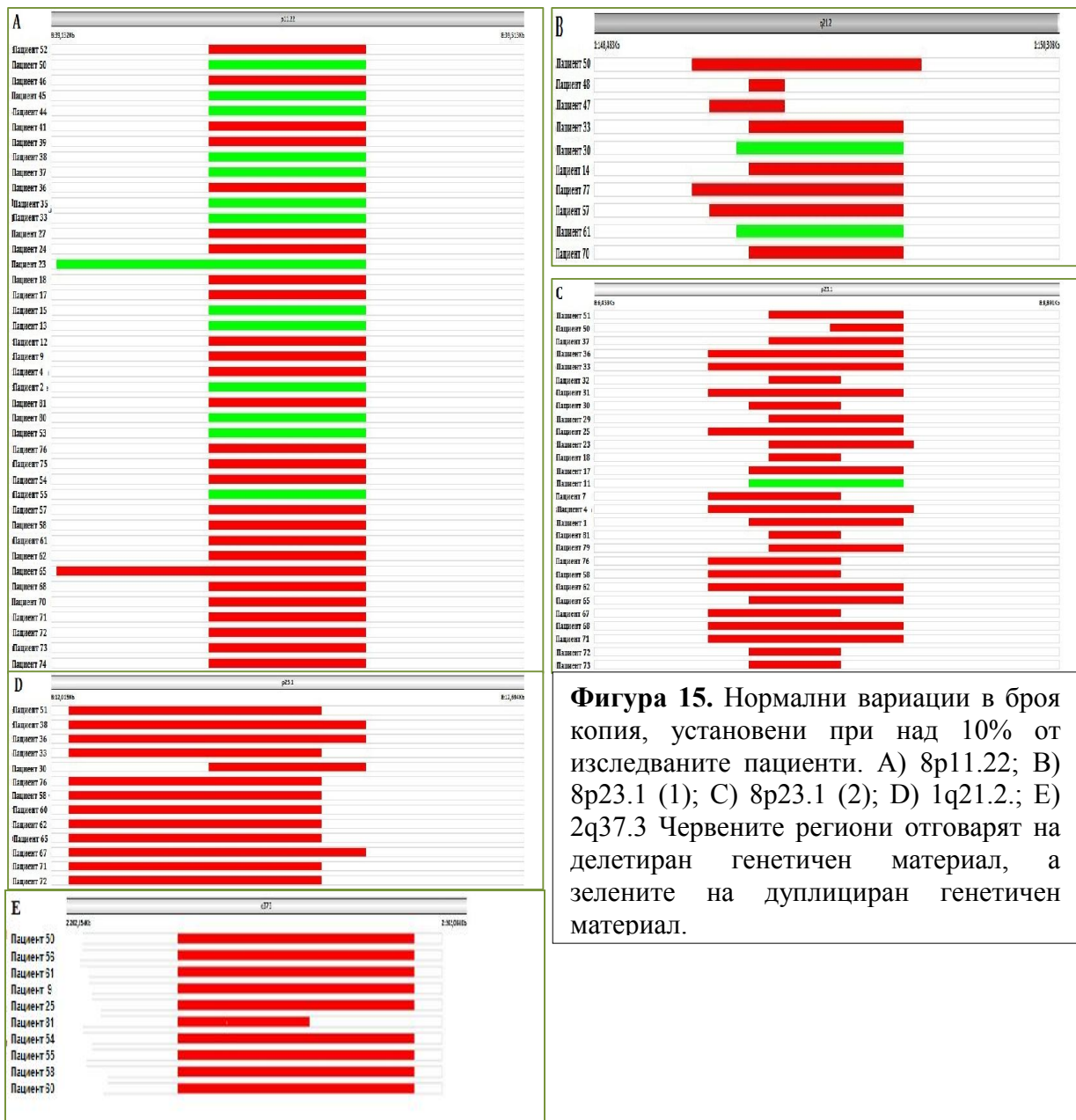


**Фигура 14.** Честота на различните нормални CNVs в изследваната група.

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. 15). 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. Масшабно 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.



**Фигура 15.** Нормални вариации в броя копия, установени при над 10% от изследваните пациенти. А) 8p11.22; В) 8p23.1 (1); С) 8p23.1 (2); Д) 1q21.2.; Е) 2q37.3 Червените региони отговарят на делетиран генетичен материал, а зелените на дуплициран генетичен материал.

## 6.2.2 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 ѝ 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.

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. 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 случая 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 и 1 OMIM 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 загрубването 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  $\sim 1 / 16,000$ . Koolen (2012) и Дзолино (2012) установяват, че хаплоинсуфициенцията на гена *KANSL1* (регулатор на хроматинната модификация), е достатъчна за развитието на 17q21.31 микроделеционния синдром<sup>322</sup>. Поради това евентуалната патологична природа на аберацията не може да бъде отхвърлена въпреки определянето ѝ от софтуерната програма като вариация с неясно клинично значение.

При друг случай - пациент 30, установената дупликация с неясно клинично значение в регион 1q21.2. съдържа 15 HGNC гена и 1 OMIM ген. 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 домени, 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. 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.

### **6.3 Обсъждане на вероятно нормалните вариации в броя копия**

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

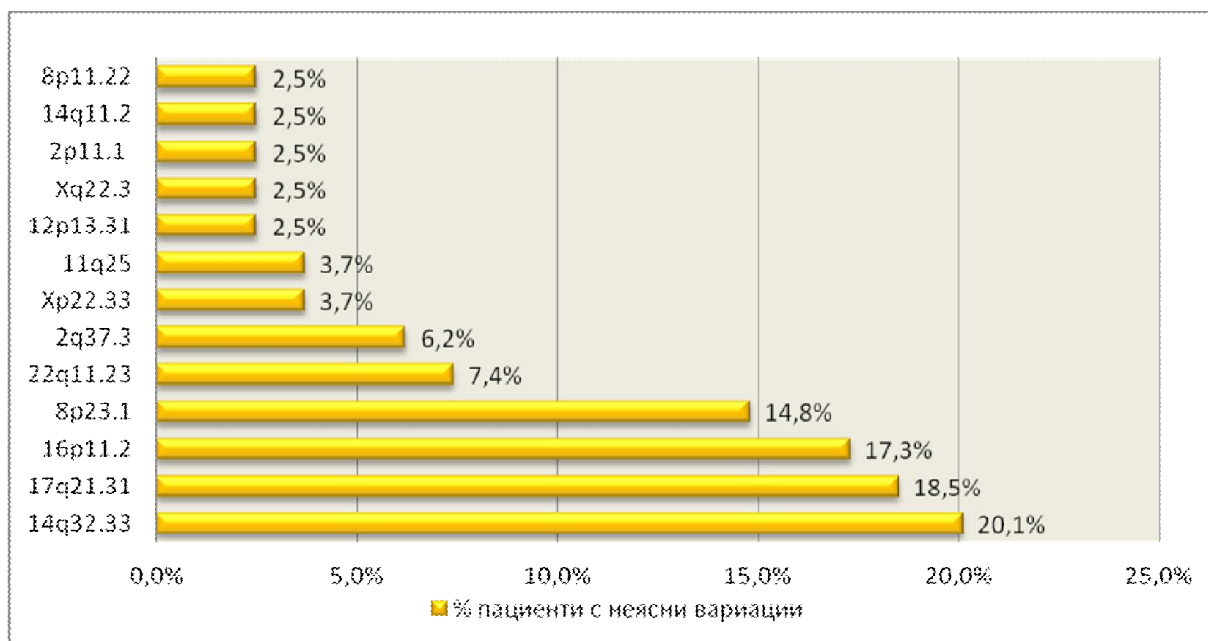
#### **6.3.1 Вариации с неясно клинично значение**

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. 16).

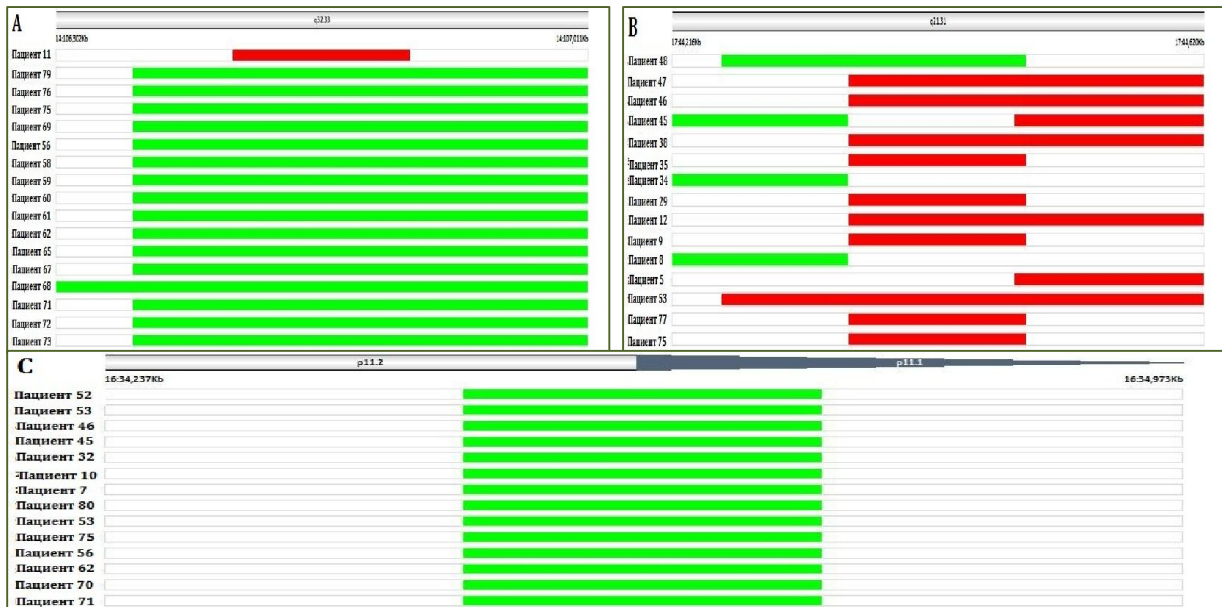


**Фигура 16.** Вариации с неясно клинично значение, установени при над 1,2% от пациентите.

Най-честите вероятно нормални вариации в проучването ни се срещат в локуси 14q32.33, 17q21.31 и 16p11.2, и са представени при над 15% от пациентите (Фиг. 17).

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



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

### 6.3.2 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.

### 6.4 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



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 заболяемостта, 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.

## 8 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,
  - ✓ *DRD1P* 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 значение);
  - ✓ 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 значение);
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 варианта – 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%).

## 9 Приноси

---

### **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“.

### **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.

## 10 Научни публикации и съобщения по темата на дисертационния труд

---

### Научни публикации във връзка с дисертационния труд

1. Редки болести и лекарства сираци; брой 2/2016г.; ISSN1314-3581; Нови геномни технологии при диагностиката на вродени аномалии; **Марта Григорова Михайлова**, Драга Иванова Тончева, Савина Петрова Хаджидекова; <http://journal.raredis.org>
2. Balkan Journal of Medical Genetics; "Benign, pathogenic and CNVs of unknown clinical significance in patients with congenital malformations/developmental delay" **Marta Mihaylova**, Rada Staneva, Draga Toncheva, Mariya Pancheva Savina Hadjidekova; in press (2017).
3. Доклади на българска академия на науките. Molecular and clinical findings in a rare interstitial deletion (3)(q24q25.33). **Marta Mihaylova**, Rada Staneva, Draga Toncheva, Savina Hadjidekova; под печат (2017).

### 11 Научни съобщения на конгреси във връзка с дисертационния труд.

---

1. Staneva, S. Hadjidekova, M. Pancheva, D. Avdjieva-Tzavella, B. Rukova, Z. Hammoudeh, O. Antonova, V. Damyanova, **M. Mihaylova**, R. Tincheva, D. Toncheva, *Copy Number Variations (CNVs) in patients with multiple malformations and intellectual disability*. European Human Genetics Conference 2016, 21-24 May, Barcelona, Spain.
2. **М. Михайлова**, Др. Тончева, С. Хаджидекова. „Вариации в броя на копията (CNVs) при пациенти с вродени аномалии и интелектуален дефицит“7-ма Национална конференция по Редки болести и лекарства сираци - „Редките заболявания в светлината на Европейските референтни мрежи“: 9-10 септември 2016 гр. Пловдив.

## 12 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 настоящия 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.

## 13 Summary

---

### **Copy number variations in children with disturbance of development**

The high frequency (3-5 %) of congenital anomalies and intellectual disabilities turn them in to a serious problem, responsible for a high percentage (33%) of neonatal mortality. 40% of the genetic causes behind this, remain unclear. In the recent years, molecular karyotyping has become the most powerful method for detection of pathogenic imbalances in patients with multiple congenital anomalies and intellectual disability. This high resolutionable method gives us the opportunity to investigate and identify candidate genes, which could explain the genotype-phenotype correlations.

In the current study the investigated groupe included 81 patients with congenital malformations, developmental delay and intellectual disability. We applied CytoChip Oligo microarray, (BlueGnome,Illumina), 4x44k, covering the whole genome with a resolution of 70 kb (kilobases). In the selected group of patients with congenital anomalies, 280 CNVs (Copy number variation) have been proven - 41 pathogenic, 118 benign and 121 of unknown clinical significance (average number of variations of the patient - 3.5). In seven patients with established pathogenic variations, our data revealed 9 pathogenic aberrations associated with the corresponding phenotype. The interpretation of the other CNVs was made based on: the frequency in the investigated group, the size of the variation, the content of genes in the region and the type of the variation (deletion or duplication).

In our analysis we proved 11 pathogenic variations associated with the phenotype of the patients, 118 benign variations, 46 variations of unknown clinical significance and finally we described a new group of a - "probably benign CNVs " - 105. It is noteworthy that in the majority of the cases the etiology of congenital anomalies remains unclear which requires further investigation to clarify their clinical significance.

#### **Future development.**

The molecular karyotyping is a suitable method for identification of genomic aberrations and has a number of advantages in the diagnosis of congenital abnormalities and intellectual disability. It was concluded that there is an obvious need to apply new genomic technologies with greater resolution, since a significant proportion of the patients were left with unclear diagnosis. This would facilitate the detection and interpretation of the genomic aberrations in order to make an accurate diagnosis and to optimize the therapeutic approaches.